TESIS DE DOCTORADO

APLICACIÓN DE LA DETECCIÓN AMBIENTAL DEL CIRCOVIRUS PORCINO TIPO 2 MEDIANTE EL USO DE LA PCR CUANTITATIVA EN EL ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO DE LA INFECCIÓN

Gonzalo López Lorenzo

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL DE LA UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA Y SANIDAD VETERINARIA

LUGO

2021

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

DECLARACIÓN DEL AUTOR/A DE LA TESIS

D./Dña. **Gonzalo López Lorenzo**

Título de la tesis: **Aplicación de la detección ambiental del Circovirus Porcino Tipo 2 mediante el uso de la PCR cuantitativa en el estudio epidemiológico de la infección**

Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento y declaro que:

1) La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.
2) De ser el caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.
3) Confirmo que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.
4) La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide la versión impresa con la presentada en formato electrónico.

Y me comprometo a presentar el Compromiso Documental de Supervisión en el caso que el original no esté depositado en la Escuela.

En **Lugo**, **22 de Julio de 2021**.

Firma electrónica

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

AUTORIZACIÓN DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS

Aplicación de la detección ambiental del Circovirus Porcino Tipo 2 mediante el uso de la PCR cuantitativa en el estudio epidemiológico de la infección

D. Gonzalo Fernández Rodríguez
D. José Manuel Díaz Cao

INFORMAN:

Que la presente tesis, se corresponde con el trabajo realizado por D. Gonzalo López Lorenzo bajo nuestra dirección, y autorizamos su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como directores de ésta no incurre en las causas de abstención establecidas en la Ley 40/2015.

De acuerdo con lo indicado en el Reglamento de Estudios de Doctorado, declaramos también que la presente tesis doctoral es idónea para ser defendida en base a la modalidad de Tesis monográfica con reproducción de publicaciones, en los que la participación del doctorando fue decisiva para su elaboración y las publicaciones se ajustan al Plan de Investigación.

En Lugo, 22 de Julio de 2021

Fdo. Gonzalo Fernández Rodríguez

Fdo. José Manuel Díaz Cao

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERESES

El doctorando declara no tener ningún conflicto de interés en relación a la presente Tesis Doctoral.

En Lugo, a 22 de Julio de 2021

Fdo. Gonzalo López Lorenzo

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

FINANCIACIÓN

Este trabajo se ha realizado gracias a la concesión de los siguientes proyectos de investigación:

- European PCV2 Award 2016. Boehringer Ingelheim Animal Health. Ingelheim, Alemania.
- Ayuda para consolidación y estructuración de unidades de investigación competitivas del Sistema Universitario de Galicia (GR2015/003). Consellería de Educación e Ordenación Universitaria. Xunta de Galicia. Investigador principal: Pablo Díez Baños.
- V Premio Laboratorios Ovejero de la Real Academia de Ciencias Veterinarias por el trabajo de investigación: "Distribución ambiental de PCV2 en granjas con infección subclínica". Concedido a Gonzalo López Lorenzo.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

PUBLICACIONES

Artículos de investigación en revistas internacionales

1. Díaz-Cao, J.M.[1], Prieto, A.[1], **López, G.**[1], Fernández-Antonio, R.[2], Díaz, P.[1], López, C.[1], Remesar, S.[1], Díez-Baños, P.[1], Fernández, G[1], 2018. Molecular assessment of visitor personal protective equipment contamination with the Aleutian mink disease virus and porcine circovirus-2 in mink and porcine farms. PLoS One 13. doi:https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203144

   [1] Departamento de Patología Animal (Grupo INVESAGA), Facultad de Veterinaria, Universidade de Santiago de Compostela, Lugo, España.

   [2] Asociación Gallega de Criadores de Visón (AGAVI), Santiago de Compostela, España.

   Editorial: Public Library Science (eISSN: 1932-6203).

   Factor de impacto (2018): 2,776; Q2 en la categoría Multidisciplinary Sciences (24/69).

   Publicación en acceso abierto. Permisos indicados en:

   https://plos.org/terms-of-use/

   Contribución del doctorando: conceptualización del trabajo, recogida de muestras, análisis laboratorial, análisis de datos, revisión del documento.

2. **López-Lorenzo, G.**[1], Díaz-Cao, J.M.[1], Prieto, A.[1], López-Novo, C.[1], López, C.M.[1], Díaz, P.[1], Rodríguez-Vega, V.[2], Díez-Baños, P.[1], Fernández, G.[1], 2019. Environmental distribution of Porcine Circovirus Type 2 (PCV2) in swine herds with natural infection. Sci Rep 9, 1–8. doi:10.1038/s41598-019-51473-6

   [1] Departamento de Patología Animal (Grupo INVESAGA), Facultad de Veterinaria, Universidade de Santiago de Compostela, Lugo, España.

   [2] Boehringer Ingelheim Salud Animal, Barcelona, España.

   Editorial: Nature Publishing Group (eISSN: 2045-2322).

   Factor de impacto (2019): 3,998; Q1 en la categoría Multidisciplinary Sciences (17/71).

   Publicación en acceso abierto. Permisos indicados en:

   https://www.nature.com/nature-portfolio/reprints-and-permissions

   Contribución del doctorando: conceptualización del trabajo, recogida de muestras, análisis laboratorial, análisis de datos, redacción del documento.

3. **López-Lorenzo, G.**[1], López-Novo, C.[1], Prieto, A.[1], Díaz, P.[1], Panadero, R.[1], Rodríguez-Vega, V.[2], Morrondo, P.[1], Fernández, G.[1], Díaz-Cao, J.M.[1], 2021. Monitoring of porcine circovirus type 2 infection through air and surface samples in vaccinated and unvaccinated fattening farms. Transbound Emerg Dis 00, 1–10. doi:10.1111/tbed.14069

   [1] Departamento de Patología Animal (Grupo INVESAGA), Facultad de Veterinaria, Universidade de Santiago de Compostela, Lugo, España.

   [2] Boehringer Ingelheim Salud Animal, Barcelona, España.

   Editorial: Wiley (eISSN: 1865-1682).

   Factor de impacto (2020): 5,005; Q1 en la categoría Veterinary Sciences (4/146).

   Autorización de la editorial para su publicación en la presente tesis: ver documento al final del manuscrito.

   Contribución del doctorando: conceptualización del trabajo, recogida de muestras, análisis laboratorial, análisis de datos, redacción del documento.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Comunicaciones a congresos

1. **López-Lorenzo, G**., Díaz-Cao, J.M., Prieto, A., López-Novo, C., López, C.M., Díaz, P., Remesar, S., Díez-Baños, P., Morrondo, P., Fernández, G., 2018. Distribución ambiental de Circovirus Porcino Tipo 2 (PCV2) en granjas no vacunadas. II Congreso Nacional de Sanidad Animal. Córdoba, España.
2. **López-Lorenzo, G**. 2018. Distribución Ambiental del Circovirus Porcino Tipo 2 (PCV2) en granjas con infección subclínica. VI Encontro de Mocidade Investigadora en Ciencias da Saúde. Santiago de Compostela, España.
3. **López-Lorenzo, G**., Díaz-Cao, J.M., Prieto, A., Díaz, P., López, C.M., Remesar, S., Díez-Baños, P., Morrondo, P., Fernández, G., 2018. Monitorización de la infección por PCV2 utilizando el aire como muestra. VI Congreso de la Asociación Nacional de Veterinarios de Porcino. Zaragoza, España.
4. **López-Lorenzo, G**., Díaz-Cao, J.M., Prieto, A., Díaz, P., López-Novo, C., Remesar, S., Panadero, R., Díez-Baños, P., Morrondo, P., Fernández, G., 2018. Circovirus Porcino Tipo 2 (PCV2): ¿Sólo está en los cerdos? VI Congreso de la Asociación Nacional de Veterinarios de Porcino. Zaragoza, España.
5. **López-Lorenzo, G**., Díaz-Cao, J.M., Prieto, A., López-Novo, C., López, C.M., Díaz, P., Remesar, S., Díez-Baños, P., Morrondo, P., Fernández, G., 2018. Distribución ambiental de Circovirus Porcino Tipo 2 en granjas no vacunadas. XLI Reunión Científica de la Asociación Peruana de Producción Animal. Lima, Perú.
6. **López-Lorenzo, G**., 2019. Estudio de la infección por Circovirus Porcino Tipo 2 (PCV2) a través del aire de las granjas. I Congreso de la Juventud Investigadora en Producción Agraria Sostenible. Lugo, España.
7. **López-Lorenzo, G**., Díaz-Cao, J.M., López-Novo, C., Prieto, A., Remesar, S., Panadero, R., López, C.M., Díaz, P., Figueras, S., Sánchez, E., Rodríguez-Vega, V., Fernández, G., 2021. The role of the farm environment in the persistence of PCV2 infection in vaccinated herds. 12th European Symposium of Porcine Health Management. Berna, Suiza.
8. **López-Lorenzo, G**., Díaz-Cao, J.M., López-Novo, C., Prieto, A., García-Dios, D., Hernández-Caravaca, I., Abella, G., Rodríguez-Vega, V., Díez-Baños, P., Morrondo, P., Fernández, G., 2021. Air sampling as useful tool for detecting and monitoring PCV2 infection. 12th European Symposium of Porcine Health Management. Berna, Suiza.
9. **López-Lorenzo, G**. 2021. Evaluación de la contaminación de los equipos de protección individual (EPI) utilizados en las visitas a las explotaciones de porcino. VIII Encontro da Mocidade Investigadora. Santiago de Compostela, España.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Artículos en revistas de divulgación

1. **López-Lorenzo, G.**, Díaz-Cao, J.M., Prieto, A., López-Novo, C., Panadero, R., López, C.M., Díaz, P., Remesar, S., García-Dios, D., Díez-Baños, P., Morrondo, P., Fernández, G., 2019. Aplicación de la detección ambiental de agentes patógenos utilizando como modelo la infección por PCV2. ¿Qué podemos aprender? Albéitar, 229, 20-22.
2. **López-Lorenzo, G.**, Díaz-Cao, J.M., Prieto, A., López-Novo, C., Panadero, R., López, C.M., Díaz, P., Remesar, S., García-Dios, D., Díez-Baños, P., Morrondo, P., Fernández, G., 2020. Aplicaçao da deteçao ambiental de agentes patogénicos utilizando como modelo a infeçao por PCV2. O que podemos aprender? Albéitar Portugal, 2, 40-42.
3. **López-Lorenzo, G**., Díaz-Cao, J.M., López-Novo, C., Prieto, A., García-Dios, D., Hernández-Caravaca, I., Abella, G., Rodríguez-Vega, V., Díez-Baños, P., Morrondo, P., Fernández, G., 2020. Papel del entorno de la granja en la persistencia de la infección por PCV-2 en explotaciones porcinas vacunadas. Suis, 170, 48-48.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

La diferencia entre tratar
enfermedades y hacer
frente a infecciones.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

AGRADECIMIENTOS

Es bien sabido que una Tesis Doctoral no es solamente fruto del trabajo individual. Como tal, en este documento también están el esfuerzo y el buen hacer de todas las personas que a lo largo de estos años me han permitido realizar este trabajo que tanto me ha aportado a nivel profesional y, sobre todo, personal.

Por esto todo quiero expresar mi agradecimiento en primer lugar mis dos directores de Tesis. Al **Dr. Gonzalo Fernández Rodríguez** por haber confiado en mí para realizar este trabajo, especialmente después de mi condición de que mi Tesis Doctoral tenía que estar directamente relacionada con el sector porcino; debo destacar la libertad que me ha proporcionado en todo momento, y sobre todo su ayuda, aportaciones, apoyo y motivación para llevar a cabo esta Tesis Doctoral y mejorar durante estos años. Al **Dr. José Manuel Díaz Cao** por todas las horas que me ha dedicado a pesar de estar gran parte de este tiempo a distancias de cientos y miles de kilómetros, por su inestimable ayuda con el tratamiento de datos y, sobre todo, por los provechosos momentos de tertulia para recargar energías cuando compartimos despacho.

En segundo lugar quiero mencionar a unas personas que han marcado el devenir de esta Tesis Doctoral y, en cierto, modo mi trayectoria profesional: **Dr. Maurice Pensaert, Dr. François Madec, Dr. Paolo Martelli, Dr. Poul Baekbo y Dr. Mathias Ritzmann**. Gracias por considerar que la propuesta de esta Tesis Doctoral era una de las mejores de Europa y que así consiguiésemos la financiación para llevarla a cabo (European PCV2 Award). Además, dicha mención me permitió representar a la Facultad de Veterinaria de Lugo en un evento con las consideradas mejores facultades y escuelas de veterinaria del continente. Gracias por permitirme vivir esa experiencia.

Relacionado con lo anterior, quiero agradecer a **Víctor Rodríguez** que, aun siendo un estudiante de 5º de Veterinaria, me informase de la existencia de esa posible fuente de financiación que, unos años después nos permitió conseguir la ayuda necesaria. Además, gracias por los ánimos durante estos años.

En este punto quiero agradecer a todos los compañeros del equipo de investigación su ayuda y sobre todo el conocimiento y las ganas de aprender que me han transmitido desde que los he conocido. Al **Dr. Pablo Díez Baños** y a la **Dra. Patrocinio Morrondo** por contribuir en mi formación con su experiencia y demostrarme que incluso con una larga trayectoria se puede seguir con la curiosidad de los primeros días. A la **Dra. Rosario Panadero**, al **Dr. Ceferino López** y al **Dr. Pablo Díaz** por su disposición para atenderme, ayudarme y orientarme todas las veces que lo he precisado durante este tiempo. A la **Dra. Ana Pérez**, a la **Dra. Eva Cabanelas**, a la **Dra. Susana Remesar**, a

David García y a **Néstor Martínez** por esos momentos de relax y desconexión que aportan cada vez que hablamos, ya sea tomando un café o en una breve visita al despacho/laboratorio. No obstante, de todos los compañeros quiero agradecer de un modo especial al **Dr. Alberto Prieto** y a **Cynthia López**. A Alberto le debo toda la formación que tengo para trabajar en un laboratorio de biología molecular, su disposición para echarme una mano desde el primer momento que llegué y sobre todo su cercanía y amistad durante estos años. A Cynthia por su disposición para acompañarme siempre en todos los "marrones que atraigo" a pesar de su tendencia a "ahogarse en un cubito de hielo" y, como no, por su paciencia con mi "shakesperiano".

Tampoco quiero olvidarme de la **Dra. Maribel Quiroga, la Dra. Ana Losada** y de **Sandra Maceiras** por dedicarme parte de su tiempo y ayudarme con el procesado y la interpretación de la histopatología.

Por otro lado, quiero agradecer a todos los veterinarios y ganaderos del sector porcino por su disposición para atenderme y sobre todo por su colaboración para poder llevar a cabo este trabajo. De un modo especial, por la extensa y desinteresada ayuda y los conocimientos que me han aportado, quiero mencionar en este documento a **Raquel Fernández, Elena Vázquez, Javier Padín, Silvia García, Xulia Gómez, María Castro, Jesús Pereira, Albano Longo, Martín Rodríguez, Paco Guinarte, Abelardo López, Juan Carlos Vecino, Mar Lara, José Manuel García, Ledicia Ferro, Marcial Marcos, Antonio Palomo, Manuel Martínez, Aníbal Vázquez, Daniel Souto, María Reborido, Julián Varela y a los hermanos Jesús y Juan López**.

También quiero incluir en estos agradecimientos a los demás doctorandos y *postdocs* de esta Facultad por compartir esta experiencia con ellos: **Almudena, Andrea, Celia, Irene, Isa, Isidro, Luz, María, Mario, Pablo, Pedro, Saskia, Silvia y Vanesa.**

Finalmente quiero agradecer todo a **mi familia**, a los que están y a los que ya no están, por haberlo dado todo por mí, por todo lo que me han enseñado a lo largo de estos años y por permitirme realizar este trabajo, disfrutar conmigo de las experiencias tan buenas que esta Tesis Doctoral me ha permitido vivir y también por estar en los momentos que uno necesita ánimos y apoyo. Desde luego tengo que dejar claro de no ser por ellos y en muchísimos casos por lo que siempre seré, "el hijo de Óscar", nunca hubiera llegado hasta aquí ni hubiera tenido la atención y ayuda de la mayor parte de las personas que he mencionado previamente. Espero que algún día os pueda devolver al menos la mitad de todo lo que habéis dado.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ÍNDICE

1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA....1
1.1 El sector porcino en España....3
1.1.1 Importancia del sector porcino en España....3
1.1.2 Proceso productivo del ganado porcino....4
1.1.3 Orientación productiva de las explotaciones de porcino....6
1.2 Etiología del PCV2....7
1.2.1 Descripción y evolución histórica de los circovirus porcinos....7
1.2.2 Organización del genoma....9
1.2.3 Genotipos....9
1.2.4 Resistencia....10
1.3 Epidemiología del PCV2....12
1.3.1 Hospedadores del PCV2....12
1.3.2 Distribución geográfica de la infección por PCV2....12
1.3.3 Dinámica de la infección....13
1.3.3.1 Dinámica característica de la infección por PCV2....13
1.3.3.2 Dinámica reciente de la infección por PCV2....15
1.3.4 Transmisión del PCV2....17
1.3.4.1 Transmisión horizontal....18
1.3.4.2 Transmisión vertical....19
1.3.5 Factores que favorecen el desarrollo de las enfermedades asociadas a la infección por PCV2....19
1.3.5.1 Factores relacionados con el virus....20
1.3.5.2 Factores relacionados con el hospedador....20
1.3.5.3 Coinfecciones con otros patógenos....21
1.3.5.4 Factores relacionados con el manejo y bioseguridad....22
1.3.5.5 Modulación del sistema inmune....23
1.4 Patogenia de la infección por PCV2....24
1.4.1 Células y tejidos diana del PCV2....24
1.4.1.1 Embriones y fetos....24
1.4.1.2 Lechones y cerdos....25

USC
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

1.4.2 Replicación del PCV2 25
1.4.3 Inmunosupresión debida a la infección por PCV2 26
1.4.4 Infección por PCV2 y respuesta inmune del organismo 26
1.4.4.1 Viremia 26
1.4.4.2 Respuesta inmune humoral a la infección por PCV2 27
1.4.4.3 Respuesta inmune celular a la infección por PCV2 28
1.4.4.4 Patogenia del Síndrome de Dermatitis y Nefropatía Porcina 29
1.5 Signos clínicos y lesiones asociadas a la infección por PCV2 29
1.5.1 Enfermedades asociadas a la infección por PCV2 29
1.5.2 Infección subclínica por PCV2 (PCV2-SI) 31
1.5.3 Enfermedad Sistémica por PCV2 (PCV2-SD) 31
1.5.4 Enfermedad Reproductiva por PCV2 (PCV2-RD) 35
1.5.5 Síndrome de Dermatitis y Nefropatía porcina (PDNS) 36
1.6 Diagnóstico de las infecciones por PCV2 38
1.6.1 Muestras utilizadas en el diagnóstico de la infección por PCV2 38
1.6.1.1 Órganos y tejidos 38
1.6.1.2 Sangre / suero 38
1.6.1.3 Fluidos orales 38
1.6.1.4 Ambientales 39
1.6.1.5 Hisopos nasales, rectales, heces y leche/calostro 39
1.6.2 Técnicas de diagnóstico disponibles 39
1.6.2.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) 39
1.6.2.2 Inmunohistoquímica (IHC) 40
1.6.2.3 Hibridación *in situ* (ISH) 41
1.6.2.4 Aislamiento vírico 41
1.6.2.5 Inmunoadsorción ligada a enzimas (ELISA) 41
1.6.2.6 Neutralización viral 41
1.6.2.7 Inmunoperoxidasa en monocapa (IPMA) 41
1.6.2.8 Inmunoadsorción ligada a enzimas de puntos (ELISPOT) 42
1.6.3 Criterios para el diagnóstico de las enfermedades asociadas a PCV2 42
1.6.3.1 Infección subclínica por PCV2 (PCV2-SI) 42

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.6.3.2 Enfermedad sistémica por PCV2 (PCV2-SD) 42
1.6.3.3 Enfermedad reproductiva por PCV2 (PCV2-RD) 43
1.6.3.4 Síndrome de Dermatitis y Nefropatía porcina (PDNS) 43
1.7 Prevención y control de la infección por PCV2 44
1.7.1 Tratamiento 44
1.7.2 Medidas de prevención distintas a la vacunación 44
1.7.2.1 Los 20 puntos de Madec 44
1.7.2.2 Genética de los cerdos 46
1.7.2.3 Control de las coinfecciones 46
1.7.2.4 Modulación del sistema inmune 46
1.7.2.5 Otras medidas 47
1.7.3 Vacunación frente a PCV2 47
1.7.3.1 Tipos de vacunas disponibles 47
1.7.3.2 Defensa inmune tras la vacunación 49
1.7.3.3 Protocolos vacunales frente a PCV2 51
1.7.3.3.1 Cerdas reproductoras y nulíparas 51
1.7.3.3.2 Lechones 53
1.7.3.3.3 Cerdas y lechones 54
1.7.3.3.4 Verracos 55
1.8 Detección ambiental de patógenos en producción de porcino 55
1.8.1 Tipos de muestras ambientales 56
1.8.1.1 Superficies 56
1.8.1.2 Aire 57
1.8.2 Aplicaciones de las muestras ambientales en producción porcina 58
1.8.2.1 Estudio de la epidemiología de enfermedades 59
1.8.2.2 Herramienta para la vigilancia de infecciones 60
1.8.2.3 Evaluación de las medidas de bioseguridad 62
1.8.2.4 Evaluación de la eficacia las medidas de limpieza y desinfección (L+D) 63

2. OBJETIVOS 65

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3. ESTUDIO I: Distribución ambiental de PCV2 en granjas comerciales de producción de porcino 69

3.1 Introducción y Objetivos 71

3.2 Materiales y Métodos 73

3.2.1 Condiciones, selección y clasificación de las granjas del estudio 73

3.2.2 Toma de muestras ambientales 76

3.2.2.1 Protocolo de toma de muestras ambientales 76

3.2.2.2 Clasificación de las muestras ambientales 78

3.2.3 Análisis laboratorial de las muestras 79

3.2.3.1 Muestras de órganos 79

3.2.3.2 Muestras de sangre 81

3.2.3.3 Muestras ambientales 81

3.2.3.4 PCR cuantitativa para PCV2 84

3.2.3.4.1 Construcción de la recta de cuantificación de la qPCR 85

3.2.3.4.2 Cálculo de la cantidad de PCV2 en cada tipo de muestra 86

3.2.4 Análisis estadístico 87

3.3 Resultados y Discusión 90

3.3.1 Características de las granjas seleccionadas 90

3.3.2 Rectas de cuantificación de la qPCR de PCV2 92

3.3.3 Presencia de la infección por PCV2 en las granjas 93

3.3.3.1 Granjas sin vacunación frente a PCV2 93

3.3.3.2 Granjas con vacunación frente a PCV2 97

3.3.4 Detección del PCV2 en el ambiente de las granjas 97

3.3.4.1 Sin vacunación frente a PCV2 97

3.3.4.2 Con vacunación frente a PCV2 99

3.3.5 Descripción de los resultados de detección del PCV2 en muestras ambientales en las distintas enfermedades asociadas a PCV2 102

3.3.5.1 Sin vacunación frente a PCV2 (PCV2–SD / PCV2–SI) 102

3.3.5.2 Con vacunación de lechones frente a PCV2 115

3.3.6 Comparación de la contaminación ambiental por PCV2 entre las distintas situaciones sanitarias respecto a la infección 123

3.3.6.1 Comparación general de los resultados obtenidos 123

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.3.6.2 Comparación de la contaminación ambiental por PCV2 en los distintos tipos de muestras y categorías ambientales. 125

4. ESTUDIO II: Monitorización de la infección por PCV2 utilizando muestras de aire y de superficies 135

4.1 Introducción y Objetivos 137

4.2 Materiales y Métodos 139

4.2.1 Descripción de las granjas 139

4.2.1.1 Confirmación de la infección por PCV2 en las explotaciones de cebo integradas con la granja de producción 139

4.2.1.2 Descripción de las explotaciones de cebo incluidas en el estudio 140

4.2.2 Monitorización de la infección por PCV2 140

4.2.2.1 Diseño del estudio 140

4.2.2.2 Toma de muestras para monitorizar la viremia de PCV2 141

4.2.2.3 Toma de muestras para monitorizar la cantidad de PCV2 en el aire 142

4.2.2.4 Toma de muestras para monitorizar la cantidad de PCV2 en las superficies 143

4.2.3 Análisis laboratorial 144

4.2.3.1 Muestras de órganos 144

4.2.3.2 Muestras de sangre 144

4.2.3.3 Muestras de aire 144

4.2.3.4 Muestras de superficies 144

4.2.3.5 PCR cuantitativa para PCV2 144

4.2.4 Análisis de datos 146

4.2.4.1 Estimación de la prevalencia de PCV2 146

4.2.4.2 Análisis estadístico 146

4.3 Resultados 148

4.3.1. Rectas de cuantificación de la qPCR de PCV2 148

4.3.2 Confirmación de la infección por PCV2 en las bandas previas al estudio 148

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.3.3 Resultados descriptivos y comparativos de la monitorización de la infección por PCV2 en los grupos vacunados y no vacunados 152
4.3.3.1 Viremia de PCV2 152
4.3.3.2 PCV2 en aire 155
4.3.3.3 PCV2 en superficies 156
4.3.3.4 Cantidad PCV2 en las muestras 159
4.3.4 Correlación entre la viremia y la cantidad de PCV2 en aire y superficies 159
4.4 Discusión 161

5. ESTUDIO III: Evaluación de la contaminación de los Equipos de Protección Individual (EPI) utilizados en las visitas a las explotaciones de porcino utilizando el PCV2 como patógeno problema 169
5.1 Introducción y Objetivos 171
5.2 Materiales y Métodos 173
5.2.1 Diseño del estudio 173
5.2.1.1 Equipo de protección individual (EPI) utilizado 173
5.2.1.2 Descripción de la visita y de la granja visitada 174
5.2.1.3 Toma de muestras para confirmar la presencia de PCV2 en el ambiente de la granja 174
5.2.1.4 Toma de muestras para evaluar la protección de los EPI 175
5.2.2 Análisis laboratorial 176
5.3 Resultados 177
5.3.1 Rectas de cuantificación de la qPCR de PCV2 177
5.3.2 Presencia de PCV2 en el ambiente de la granja 177
5.3.3 Evaluación de la protección de los EPI 177
5.4 Discusión 180

6. CONCLUSIONES 185

7. RESUMEN – RESUMO – ABSTRACT 189

8. BIBLIOGRAFÍA 207

9. ANEXOS 235

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
AUC	Área bajo la curva
ºC	Grado Celsius
cm	Centímetro
Ct	Ciclo umbral de la qPCR
DEP	Diarrea Epidémica Porcina
d_T	Tiempo medio de generación de enfermedad
ELISA	Inmunoadsorción ligada a enzimas
ELISPOT	Inmunoadsorción ligada a enzimas de puntos
EPI	Equipo de protección individual
H-E	Hematoxilina-Eosina
IFN-γ	Interferón gamma
IHC	Inmunohistoquímica
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
IPMA	Inmunoperoxidasa en monocapa
ISH	Hibridación *in situ*
kg	Kilogramo
km	Kilómetro
L/min	Litros por minuto
Log2	Logaritmo binario
Log10	Logaritmo decimal
L+D	Limpieza y desinfección
mg	Miligramo
ml	Mililitro
m^2	Metro cuadrado
m^3	Metro cúbico
nm	Nanómetro
NK	Célula natural killer
ORF	Fragmento de lectura abierto
PBMC	Célula mononuclear en sangre periférica
PBS-T	Tampón fosfato salino con Tween 20
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PCV	Circovirus Porcino
PCV1	Circovirus Porcino Tipo 1
PCV2	Circovirus Porcino Tipo 2

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

PCV3	Circovirus porcino Tipo 3
PCV4	Circovirus porcino Tipo 4
PCV2-SD	Enfermedad sistémica por Circovirus Porcino Tipo 2
PCV2-SI	Infección subclínica por PCV2
PCV2-RD	Enfermedad reproductiva por PCV2
PCV2-VAC	Vacunación de lechones frente a PCV2
PDNS	Síndrome de Dermatitis y Nefropatía porcina
PMWS	Síndrome de Desmedro Multisistémico Postdestete
PRRS	Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino
ppm	Partes por millón
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (o en tiempo real)
R_0	Ratio de reproducción
τ	Tau de kendall
µl	Microlitro

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales características de los circovirus porcinos.....7

Tabla 2. Genotipos de PCV2. 10

Tabla 3. Principales virus y bacterias detectados en casos de Enfermedad Sistémica por PCV2 (PCV2-SD) 21

Tabla 4. Factores de bioseguridad y manejo que influyen en el riesgo de padecer PCV2-SD. 23

Tabla 5. Enfermedades asociadas a la infección por PCV2: principales signos clínicos y lesiones 30

Tabla 6. Grado de afectación de distintos sistemas orgánicos en cada enfermedad asociada a PCV2.....31

Tabla 7. Signos clínicos observados según el momento de infección en las cerdas gestantes.....36

Tabla 8. Principales técnicas directas e indirectas utilizadas en el diagnóstico de PCV2 39

Tabla 9. Plan de los 20 puntos de Madec 45

Tabla 10. Vacunas comerciales frente a PCV2 disponibles actualmente en España .48

Tabla 11. Categorías ambientales establecidas y muestras incluidas en cada una de ellas.....79

Tabla 12. Pasos, reactivos y tiempos utilizados para la inclusión en parafina.....80

Tabla 13. Protocolo de tinción Hematoxilina – Eosina 80

Tabla 14. Protocolo de extracción de ADN para el kit High Pure PCR Template Preparation Kit para cada tipo de muestra 82

Tabla 15. Reactivos del kit EXOone PCV2 OneMix.....84

Tabla 16. Protocolo térmico de la PCR en tiempo real empleada.....85

Tabla 17. Variables incluidas en el estudio estadístico 87

Tabla 18. Test estadísticos utilizados en la comparación entre granjas 88

Tabla 19. Pruebas estadísticas utilizadas en la comparación entre categorías ambientales en cada situación sanitaria de PCV2.....88

Tabla 20. Pruebas estadísticas utilizadas para la comparación entre estatus y para comparar una misma categoría entre las situaciones sanitarias de PCV2.....89

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 21. Descripción de las granjas sin vacunación frente a PCV2 91

Tabla 22. Descripción de las granjas con pauta vacunal frente a PCV2 92

Tabla 23. Resultados de la detección de PCV2 en granjas sin vacunación 93

Tabla 24. Resultados de la cuantificación de PCV2 en los órganos estudiados mediante qPCR.....94

Tabla 25. Resultados descriptivos de las muestras ambientales en cada granja sin vacunar frente a PCV2.....97

Tabla 26. Comparaciones pareadas entre granjas sin vacunación.....98

Tabla 27. Resultados descriptivos de las muestras ambientales en cada granja con vacunación frente a PCV2.....100

Tabla 28. Comparaciones pareadas entre granjas con vacunación 100

Tabla 29. Número de copias de PCV2 por hisopo en las muestras ambientales de la granja con PCV2-SD 103

Tabla 30. Resultados descriptivos de las muestras ambientales en cada categoría en la granja con PCV2-SD 104

Tabla 31. Número de copias de PCV2 por hisopo en cada muestra ambiental de cada granja con PCV2-SI.....105

Tabla 32. Resultados descriptivos de las muestras ambientales en cada categoría en granjas con PCV2-SI 107

Tabla 33. Comparaciones pareadas entre las categorías de las granjas con PCV2-SI 107

Tabla 34. Número de copias de PCV2 por hisopo en cada muestra ambiental de cada granja con PCV2-VAC.....115

Tabla 35. Resultados descriptivos de las muestras ambientales en cada categoría en las granjas con PCV2-VAC. 117

Tabla 36. Comparaciones pareadas entre las distintas categorías de las granjas con PCV2-VAC.....118

Tabla 37. Resultados descriptivos de las muestras ambientales en cada situación sanitaria respecto a PCV2 123

Tabla 38. Comparaciones pareadas entre las tres situaciones respecto a PCV2.....124

Tabla 39. Promedio de copias de PCV2 en cada muestra ambiental en cada situación sanitaria 126

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 40. Comparaciones pareadas de las categorías entre las tres situaciones sanitarias 128

Tabla 41. Número de cerdos en cada explotación de cebo y número de animales muestreados en cada visita 142

Tabla 42. Resultados del análisis mediante qPCR de PCV2 en los órganos de las bajas de las bandas de cebo previas a las incluidas en el estudio 151

Tabla 43. Resultados del análisis mediante qPCR de PCV2 en las muestras de sangre de cerdos de las bandas de cebo previas a las incluidas en el estudio 151

Tabla 44. Monitorización de la viremia de PCV2 en la población de los Grupos A (Control), B y C 154

Tabla 45. Comparaciones pareadas entre los tres grupos del AUC de la viremia, PCV2 en aire y PCV2 en superficies para cada intervalo entre muestreos consecutivos ... 155

Tabla 46. Monitorización de las copias de PCV2/m^3 aire en los Grupos A (Control), B y C 157

Tabla 47. Monitorización de las copias de PCV2/hisopo en las superficies de las granjas de los Grupos A (Control), B y C 158

Tabla 48. Correlaciones entre el promedio de la viremia de PCV2 y el promedio de PCV2 en las muestras de aire y de superficies 160

Tabla 49. Tipo de muestra, protocolo de muestreo y número de muestras incluidas en los grupos de EPI certificados y de EPI convencionales 175

Tabla 50. Resultados de la presencia de PCV2 en el ambiente de la granja 177

Tabla 51. Resumen de los resultados de las muestras tomadas en el grupo de EPI Certificados 178

Tabla 52. Resumen de los resultados de las muestras tomadas en el grupo de EPI Convencional 178

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Evolución del sector porcino en España durante los últimos años. 3

Figura 2. Evolución del sacrificio de cerdos en España y sus exportaciones 4

Figura 3. Esquema de distintos tipos de producción porcina en fases 4

Figura 4. Diagrama de la producción porcina intensiva. 5

Figura 5. ORF en el PCV2 9

Figura 6. Eficacia *in vitro* de algunos desinfectantes frente a PCV2 11

Figura 7. Países en los que se ha detectado la infección por PCV2 13

Figura 8. Ejemplo de la dinámica de infección por PCV2 en una granja de cerdos sin vacunar. 14

Figura 9. Ejemplo de la dinámica de infección por PCV2 en una población de cerdos vacunados 15

Figura 10. Esquema de posibles situaciones en la dinámica actual de la infección por PCV2 en granjas que incluyen al PCV2 en el programa vacunal de los lechones. 16

Figura 11. Fluidos en los que se puede excretar PCV2 y cantidad aproximada en cerdos no vacunados. 17

Figura 12. Modelo de la progresión de la infección por PCV2 26

Figura 13. Evolución de la viremia y la respuesta inmune humoral tras la infección por PCV2 27

Figura 14. Cerdo afectado por PCV2-SD comparado con un cerdo sano. 32

Figura 15. Depleción linfoide e inflamación granulomatosa en un ganglio linfático de un cerdo con PCV2-SD. 33

Figura 16. Neumonía intersticial por PCV2 33

Figura 17. Cerdo afectado por el PDNS. 37

Figura 18. Resultados de una qPCR tras una amplificación con cantidad seriada de ADN. 40

Figura 19. Respuesta de anticuerpos neutralizantes de cada vacuna tras su administración y posterior desafío con PCV2 50

Figura 20. Respuesta de la producción de células secretoras de IFN-γ de cada vacuna tras su administración y posterior desafío con PCV2 51

Figura 21. Posibles planteamientos y pautas vacunales frente a PCV2 para las cerdas reproductoras. 52

Figura 22. Ganancia media diaria de lechones vacunados frente a PCV2. 54

Figura 23. Esquema de un colector Andersen. 57

Figura 24. Esquema de un AGI y un colector líquido ciclónico 57

Figura 25. Esquema de colector de filtrado. 58

Figura 26. Visitas realizadas a las granjas con y sin vacunación frente a PCV2 y tareas realizadas en cada una. 74

Figura 27. Dilución seriada para elaborar la recta de cuantificación de la qPCR para PCV2 86

Figura 28. Rectas de cuantificación utilizadas para calcular el número de copias de PCV2 en cada muestra. 92

Figura 29. Granja E Bazo 3. Tinción H-E 4x. 95

Figura 30. Granja E Pulmón 3. Tinción H-E 4x. 95

Figura 31. Granja E Ganglio linfático Inguinal 3. Tinción H-E 4x. 96

Figura 32. Granja E Bazo 3. Tinción H-E 40x. 96

Figura 33. Granja E Pulmón 3. Tinción H-E 40x. 96

Figura 34. Distribución del logaritmo decimal del número de copias de PCV2 en las muestras positivas en cada granja sin vacunar. 98

Figura 35. Distribución del logaritmo decimal del número de copias de PCV2 en las muestras positivas de cada granja que vacunaba a los lechones. 101

Figura 36. Distribución del logaritmo decimal del número de copias de PCV2 en las muestras positivas de cada categoría en la granja con PCV2-SD. 104

Figura 37. Distribución del logaritmo decimal del número de copias de PCV2 en las muestras positivas en cada categoría en las granjas con PCV2-SI. 108

Figura 38. Distribución del logaritmo decimal del número de copias de PCV2 en las muestras positivas de cada categoría en las granjas PCV2-VAC. 119

Figura 39. Distribución del número de copias de PCV2 en las muestras positivas en cada situación sanitaria respecto a la infección por PCV2. 125

Figura 40. Distribución del logaritmo decimal del número de copias de PCV2 en las muestras positivas de cada categoría en cada estatus sanitario respecto a PCV2. 129

Figura 41. Porcentaje que representa cada categoría sobre el total de muestras positivas en cada situación sanitaria de la infección. 129

Figura 42. Representación esquemática de los cebaderos incluidos en el estudio. .140

Figura 43. Esquema en el que se representa el origen y el tiempo entre las bandas de cebo incluidas en el estudio.....141

Figura 44. Colector y filtros utilizados para la toma de muestras de aire.....142

Figura 45. Signos clínicos compatibles con PCV2 en las bandas de producción previas al estudio 148

Figura 46. Bazo Cerdo 1. Tinción H-E 10x.....149

Figura 47. Ganglio linfático inguinal Cerdo 1. Tinción H-E 10x.....149

Figura 48. Pulmón Cerdo 1. Tinción H-E 10x. 149

Figura 49. Bazo Cerdo 2. Tinción H-E 10x.....150

Figura 50. Ganglio linfático inguinal Cerdo 2. Tinción H-E 10x.....150

Figura 51. Pulmón Cerdo 2. Tinción H-E 10x.. 150

Figura 52. Evolución del Log10 del promedio de copias de PCV2+1 en los Grupos A (Control), B y C.....153

Figura 53. Correlación entre la viremia de PCV2 en la población y la cantidad de PCV2 en aire (A) y en superficies (B).....160

Figura 54. Modelo de la indumentaria vestida por cada miembro de los equipos ...174

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

1.1 El sector porcino en España

1.1.1 Importancia del sector porcino en España

Desde el año 2015 España es el tercer país del mundo con mayor censo de ganado porcino (tras China y Estados Unidos), manteniendo desde ese año una tendencia creciente en número de cerdos (Figura 1.A). Este incremento se observa en todas las categorías de cerdos, aunque especialmente en lechones y cebo, ligado al incremento de la prolificidad de las cerdas reproductoras. Paradójicamente, el número de granjas de porcino ha disminuido, situación que ocurre debido al descenso en el número de explotaciones más pequeñas; en cambio, las granjas de mayor capacidad han incrementado su número de forma progresiva. Hay menos granjas, pero con más cerdos (Figura 1.B) (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2020).

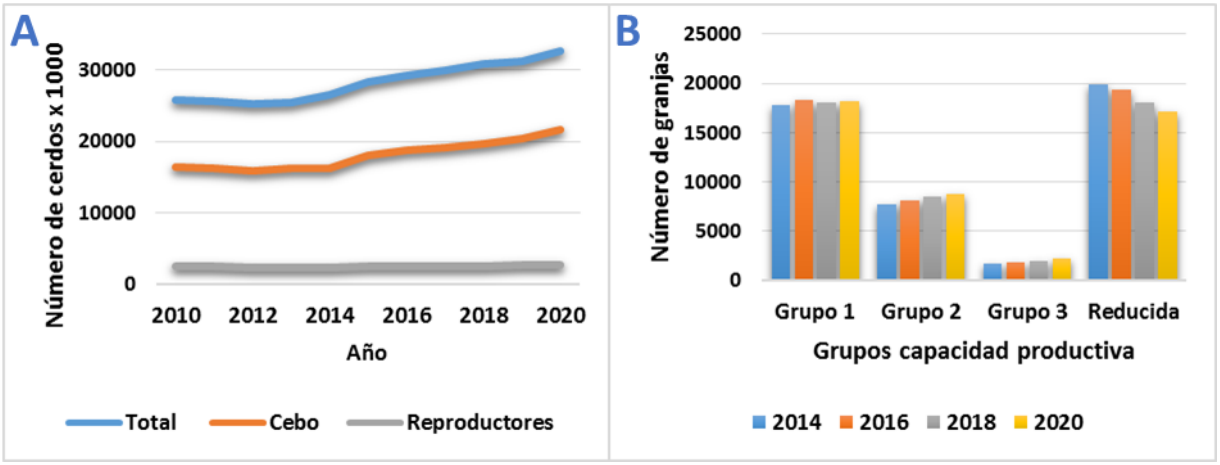


Figura 1. Evolución del sector porcino en España durante los últimos años. A. Censo de cerdos. B. Número de granjas de porcino por categoría productiva. Fuente: Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación, 2020.

Estos niveles productivos y estructurales hacen que en España la producción de porcino representase durante el año 2019 el 42 % de la producción final ganadera y el 16,20 % de la producción final agraria (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2020).

Paralelamente al incremento del censo, el número de cerdos sacrificados y de producción de carne han aumentado. Los datos del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación muestran que se sacrifican más cerdos, y con mayor peso en canal (Figura 2.A). Teniendo en cuenta que el consumo de carne de cerdo en España se ha mantenido estable durante la última década (consumo *per cápita* mínimo en 2012, 49,70 kg, y máximo en 2018, 56,60 kg), el incremento de producción y de sacrificio conllevó que en el año 2019 se alcanzase un abastecimiento del 188 %. De esta forma, actualmente casi la mitad de la producción del sector porcino español se destina a la

exportación, con una tendencia creciente (Figura 2.B), siendo sus principales destinos China, Francia, Italia, Portugal, Japón, Polonia y Filipinas (Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación, 2020).

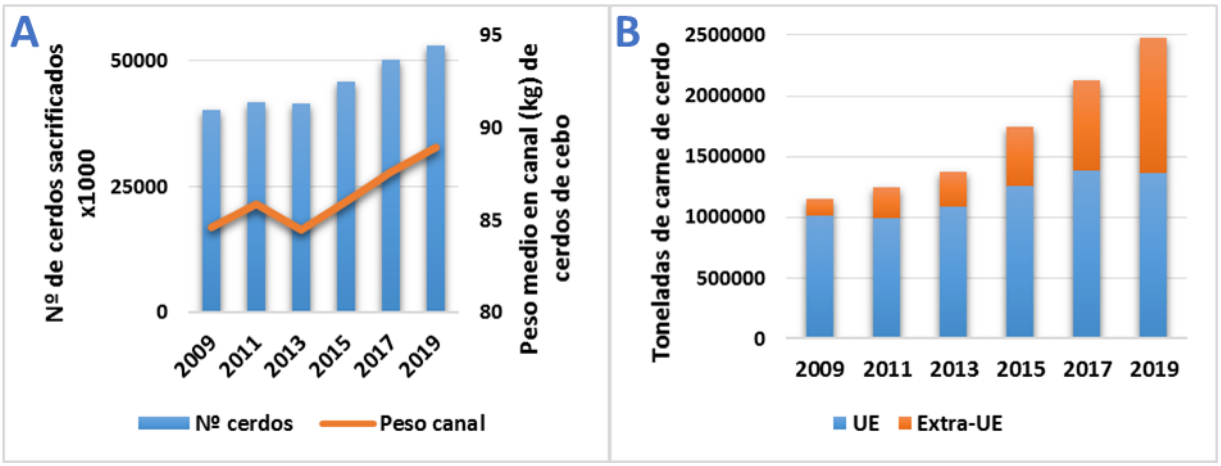


Figura 2. Evolución del sacrificio de cerdos en España y sus exportaciones. A. Número de cerdos sacrificados y del peso en canal. B. Exportaciones de carne de cerdo. Fuente: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2020.

1.1.2 Proceso productivo del ganado porcino

El proceso de producción del ganado porcino, de forma muy resumida, consta del ciclo de las cerdas reproductoras (o fase I) y las etapas de post-destete o transición (o fase II) y cebo (o fase III) (Ciria y Asenjo, 1999). Estas tres fases pueden estar localizadas en un mismo sitio, o cada una en un sitio diferente. No obstante, actualmente la situación más habitual es la producción en dos fases, estando en una granja las cerdas reproductoras y la transición de los lechones, realizando el cebo en un sitio distinto (Figura 3). En el caso de producciones en 2 y 3 fases, lo más habitual es trabajar en un régimen de integración, es decir, una granja de origen produce lechones que siempre realizan las fases de transición y/o cebo en las mismas granjas.

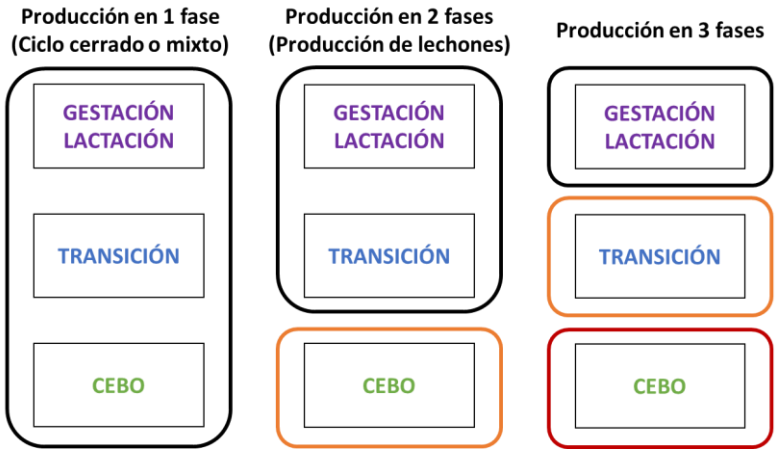


Figura 3. Esquema de distintos tipos de producción porcina en fases. Bordes de distintos colores indican localizaciones geográficas distintas.

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

El ciclo de las cerdas reproductoras incluye la cubrición (aproximadamente 5-10 días tras el destete), la gestación (115 días) y el parto-lactación (21-28 días). En los sistemas de producción intensiva, normalmente cuando los lechones tienen entre 21 y 28 días de vida se destetan y se trasladan a las dependencias de transición. En éstas permanecen hasta que tienen entre 8 y 10 semanas de edad, cuando se trasladan a las dependencias donde se realiza la fase de cebo o engorde. Cuando esos lechones se destetan, las cerdas reproductoras correspondientes a esas camadas se trasladan a una zona donde en los días posteriores se inseminan y comienzan otro ciclo reproductivo (Figura 4).

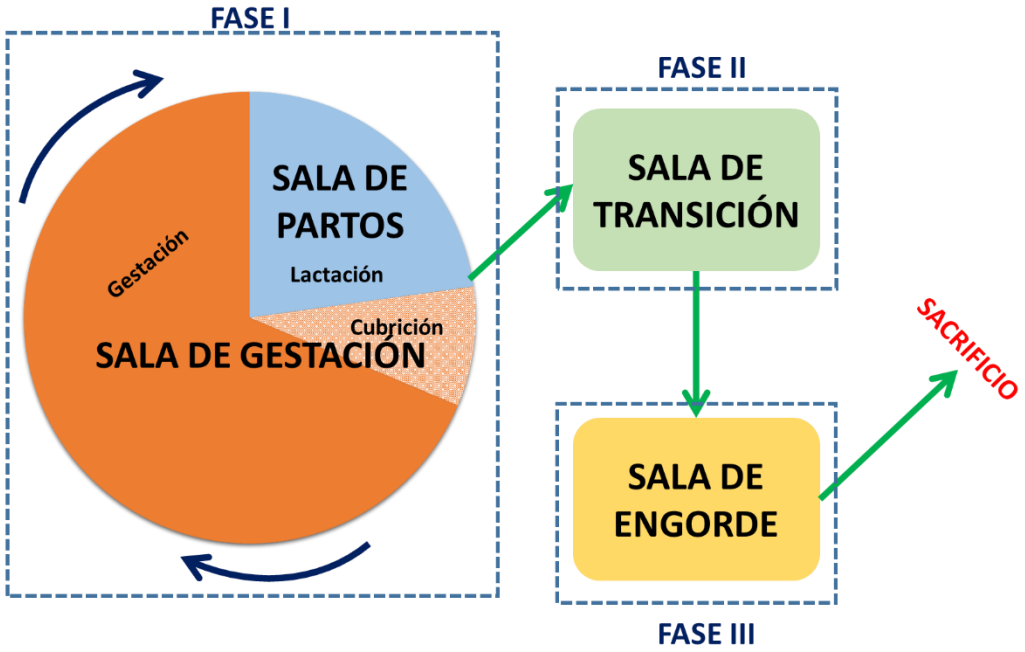


Figura 4. Diagrama de la producción porcina intensiva. Las flechas azules indican el movimiento de las cerdas reproductoras; las flechas verdes el de los lechones y cerdos de cebo.

Esta producción en fases tiene como objetivo facilitar el manejo de las granjas y al mismo tiempo reducir la transmisión de enfermedades, mejorando así la productividad y los rendimientos. De esta forma, cada fase productiva se aloja exclusivamente en unas salas o dependencias, garantizando así una barrera física con los demás cerdos de la granja. Además, el manejo de la mayor parte de estas salas se realiza en lo denominado "todo dentro – todo fuera", es decir, en cada sala solo hay un lote o banda de cerdos, los cuales entran y salen de esa dependencia al mismo tiempo (Buxadé *et al.*, 2007).

En general, en la mayoría de las granjas de porcino hay al menos las siguientes dependencias:

- Salas de gestación: se localizan las cerdas gestantes y las que están en espera de cubrición (se incluyen las cerdas en post destete y antes de la cubrición).

- Salas de partos: generalmente se alojan las cerdas desde una semana pre-parto hasta el momento en que se destetan sus lechones. En esta sala conviven las cerdas adultas con sus camadas.
- Salas de transición: alojan a los lechones desde que se destetan hasta que tienen entre 8 y 10 semanas de edad.
- Salas de cebo: alojan a los cerdos desde las 8 – 10 semanas de edad hasta su edad de sacrificio. En caso de granjas que realicen reposición propia también suelen incluir esas futuras reproductoras. Asimismo puede haber granjas que no realicen la fase de cebo pero sí tengan reposición propia.
- Almacenes: sirven para guardar enseres y utensilios de manejo.
- Vestuarios/oficinas: dependencias destinadas al cambio de ropa de los trabajos y al trabajo administrativo.

1.1.3 Orientación productiva de las explotaciones de porcino

Según el Real Decreto 306/2020 , las granjas de porcino pueden tener diferentes orientaciones productivas, entre ellas:

- Selección: se dedican a la selección de cerdos de razas puras o híbridos.
- Multiplicación: dedicadas a la producción de cerdos de razas puras o híbridos.
- Recría de reproductores: dedicadas a la recría de futuros reproductores.
- Centro de recogida de esperma porcino: granjas dedicadas únicamente para la recogida de semen de verracos y su comercialización.
- Transición de lechones: explotaciones que albergan lechones durante su fase de transición.
- Producción: dedicadas a la producción de lechones. Según el destino de los lechones que se producen se diferencian:
    - Ciclo cerrado: los lechones se ceban en la propia granja de origen. La misma granja dispone de instalaciones que posibilitan todas las fases.
    - Producción de lechones: el destino de los lechones es otra granja de transición de lechones o una explotación de cebo (en este caso, la transición de los lechones se realiza en la propia granja de origen).
    - Tipo mixto: parte de los lechones se recrían y ceban en la propia granja, mientras que otra parte realiza esta fase en una granja distinta.
- Cebo: explotaciones dedicadas al engorde de lechones con destino final a matadero. Pueden ser:
    - Cebo: albergan lechones desde el final de la fase de transición hasta el final de cebo.
    - Cebo desde destete a acabado: albergan las fases de transición y cebo de lechones.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.2 Etiología del PCV2

1.2.1 Descripción y evolución histórica de los circovirus porcinos

Los circovirus que infectan a los cerdos (PCV, por sus siglas en inglés) taxonómicamente se incluyen en el género *Circovirus* dentro de la familia *Circoviridae*. Se trata de virus no envueltos, con una cápside de simetría icosaédrica que protege a una cadena simple de ADN circular, la cual está compuesta por entre 1700 y 2000 nucleótidos, dependiendo de la especie (King *et al.*, 2012; Opriessnig *et al.*, 2020). Este número tan reducido de nucleótidos y la ausencia de envoltura externa hace que sean virus con un diámetro de tan solo 12 – 23 nm (Tischer *et al.*, 1982). De hecho, se consideran los virus más pequeños capaces de infectar a los mamíferos (Finsterbusch y Mankertz, 2009).

Hasta la fecha se han identificado cuatro circovirus que pueden infectar a los cerdos, los cuales se han nombrado de forma secuencial: PCV1, PCV2, PCV3 y PCV4 (Opriessnig *et al.*, 2020). En la Tabla 1 se indican las principales características de cada uno de ellos.

Tabla 1. Principales características de los circovirus porcinos. Modificado de Opriessnig *et al.*, (2020).

	PCV1	PCV2	PCV3	PCV4
Año de descubrimiento	1974	1997	2016	2019
Distribución	Mundial	Mundial	Mundial	China
Prevalencia	Baja	Alta	Alta	Desconocida
Nucleótidos en el genoma	1758 - 1760	1766 - 1769	1999- 2001	1770
Diversidad genética	Baja	Alta (8 genotipos)	Media*	Desconocida
Patógeno en condiciones de campo	No	Si	Si	Si
Primer aislamiento en algún cultivo celular	1974	1977	2020	No exitoso

*Se ha observado cierta diversidad genética, pero aún hay consenso para considerarlos como subtipos

El PCV1 fue el primero que se identificó. Se detectó en 1974 como un contaminante en un cultivo de una línea celular de riñón de cerdo. En los siguientes años se detectaron anticuerpos frente a este virus en suero de cerdos a lo largo de países de Europa y de América, aunque se consideró un virus no patógeno (Tischer *et al.*, 1982, 1995).

A finales de la década de 1990 se describió y comenzó a diagnosticar una enfermedad conocida inicialmente como Síndrome de Desmedro Multisistémico

Postdestete (PMWS, por sus siglas en inglés), descrita por primera vez en España en 1997 (Harding y Clark, 1997; Segalés *et al.,* 1997; Harding *et al.*, 1998). Este proceso se observaba principalmente en granjas de cerdos con un buen estado sanitario. En los animales afectados, se observó un virus similar al PCV1 (Allan *et al.*, 1998), sin embargo, estudios posteriores mostraron que la etiología de este síndrome se debía a un nuevo virus del mismo género, que se denominó PCV2 (Allan *et al.*, 1999). Este nuevo virus presentaba una homología en torno al 80% de los nucleótidos (Allan y Ellis, 2000), y tenía 9 nucleótidos más (Hamel *et al.*, 1998; Mankertz *et al.*, 2000).

En los siguientes años se comprobó que la infección por PCV2 era ubicua a nivel global y de granja, y también se consideró a este virus como el causante del Síndrome de Dermatitis y Nefropatía Porcina (PDNS, por sus siglas en inglés) (Chae, 2005; Segalés *et al.*, 2005a). Independientemente de que desarrollen o no enfermedad, la mayor parte de los cerdos presentaban anticuerpos (Larochelle *et al.*, 2003), considerando desde entonces que las enfermedades asociadas a PCV2 eran multifactoriales, es decir, son necesarios otros factores para su desarrollo (Segalés *et al.*, 2013). Desde su descubrimiento, este virus se convirtió en uno de los más estudiados en el sector porcino y, probablemente, es una de las infecciones que más modificaciones ha sufrido en su epidemiología, principalmente debido a la presión que ha ejercido la vacunación frente a PCV2 (Afghah *et al.*, 2017).

En el año 2016 se detectó por primera vez un nuevo circovirus, que se denominó PCV3 (Phan *et al.*, 2016). Se asoció a cerdos afectados por miocarditis y enfermedad respiratoria, y a cerdas adultas con casos de PDNS y fallos reproductivos (Phan *et al.*, 2016; Ku *et al.*, 2017; Palinski *et al.*, 2017). Observaciones posteriores mostraron que el PCV3 también es un virus ubicuo a nivel mundial, pudiendo alcanzar unas prevalencias elevadas de infección en algunos países variable (Stadejek *et al.*, 2017; Franzo *et al.*, 2018; Kim *et al.*, 2018). Esta infección se ha detectado desde lechones lactantes hasta cerdas adultas, con una gran tasa de infecciones subclínicas pero sin mostrar una dinámica de infección homogénea (Klaumann *et al.*, 2019; Opriessnig *et al.*, 2020). Así, aunque asociado a algunos casos con patologías, todavía no se ha confirmado que la infección por PCV3 sea suficiente para desarrollar alguna enfermedad (Kim *et al.*, 2018; Klaumann *et al.*, 2018; Saporiti *et al.*, 2020).

Finalmente, en el año 2019 se describió un nuevo circovirus, denominado PCV4, que fue aislado en cerdos de final de transición-inicio de cebo con signos clínicos respiratorios, digestivos y con Síndrome de Dermatitis y Nefropatía Porcina (Zhang *et al.*, 2020). Poco más se sabe todavía de ese PCV4, del que de momento no se han notificado infecciones en España (Franzo *et al.*, 2020).

1.2.2 Organización del genoma

El genoma del PCV2 está formado por una cadena simple de ADN circular, compuesta por 1766 – 1769 nucleótidos, con una organización ambisentido y en el que se han diferenciado hasta 11 regiones, o fragmentos de lectura (ORF, por sus siglas en inglés). Se denominan desde ORF1 hasta ORF11 (Figura 5), y de ellos destacan principalmente dos.

El ORF1 es el más grande y el que menos variaciones presenta (Ren *et al.*, 2016). Codifica la información necesaria para las proteínas encargadas de la replicación del virus, de las cuales destacan Rep (312 aa (aminoácidos)) y Rep' (178 aa) (Finsterbusch y Mankertz, 2009).

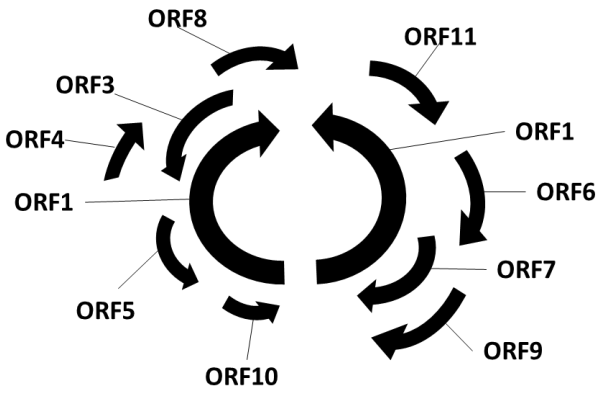


Figura 5. ORF en el PCV2. Adaptado de Ren *et al.*, 2016.

El ORF2 es el que codifica la información para la proteína Cap (233 aa), la cual es la responsable de la formación de la cápside del virus (Finsterbusch y Mankertz, 2009). Esta cápside es el principal antígeno del PCV2 y la que provoca la mayor respuesta inmune (Nawagitgul *et al.*, 2000). Este ORF2 presenta variaciones, motivo por el que se utiliza en los estudios filogenéticos y es el responsable de la diferenciación entre genotipos de PCV2 (Olvera *et al.*, 2007; Trible y Rowland, 2012).

Otros ORF que se han estudiado son el ORF3 y el ORF4. El ORF3 está implicado en la apoptosis de las células infectadas por el PCV2, mientras que el ORF4 juega el papel opuesto al restringir la transcripción de ORF3 y por tanto evitado la apoptosis inducida por el PCV2 (Liu *et al.*, 2005; Gao *et al.*, 2014).

Hasta la fecha, los demás ORF no están tan estudiados, pero se sabe que varios de ellos participan en la expresión de citoquinas e interleucinas en las células que infecta el virus, así como dando una función estructural (Li *et al.*, 2018).

1.2.3 Genotipos

Tradicionalmente la clasificación genotípica del PCV2 se ha basado en la búsqueda de divergencias en más de un 3,5%, de los nucleótidos de la ORF2, o un 2,0% en el caso del genoma completo (Grau-Roma *et al.*, 2008; Segalés *et al.*, 2008). Actualmente la diferenciación en genotipos se basa en la distancia genética entre los nucleótidos de la ORF2, siendo necesaria una *p*-distancia máxima de un 13% dentro del genotipo, un

bootstrap support (confiabilidad intraclado) en el correspondiente nodo interno mayor del 70 % y disponer de al menos 15 secuencias identificadas (Franzo y Segalés, 2018).

Como se indica en la Tabla 2, a lo largo del tiempo se han ido identificando más genotipos de PCV2 y unos han sustituido a otros como predominantes. Es importante mencionar que se han identificado varios genotipos infectando a un mismo cerdo, lo cual podría favorecer la recombinación entre ellos (Hesse *et al.*, 2008; Zhai *et al.*, 2011). Asimismo, algunos resultados sugieren que la coinfección entre distintos genotipos contribuye al desarrollo de una forma más severa de la Enfermedad Sistémica por PCV2 (PCV2-SD) (Harding *et al.*, 2010).

Tabla 2. Genotipos de PCV2.

Genotipo	Observaciones	Referencia
PCV2a	Distribución mundial. Predominante hasta el 2003, comenzó a ser sustituido por el PCV2b. Las vacunas se basan en este genotipo.	Carman *et al.*, 2008; Dupont *et al.*, 2008; Segalés *et al.*, 2008; Chae, 2012
PCV2b	Distribución mundial. Comenzó a ser predominante tras la implantación de la vacunación. Su aparición coincidió con brotes de enfermedad. Asociado a cuadros clínicos más severos que el PCV2a. Predominante hasta 2014, comenzó a ser sustituido por el PCV2d.	Gagnon *et al.*, 2007; Segalés *et al.*, 2008; Shen *et al.*, 2012; Wieland *et al.*, 2012; Franzo *et al.*, 2015a; Dvorak *et al.*, 2016
PCV2c	Genotipo menor. Descrito en Dinamarca en muestras de 1980 y en jabalíes de Brasil.	Dupont *et al.*, 2008; Franzo *et al.*, 2015b
PCV2d	Distribución mundial. Inicialmente fue considerado una mutación de PCV2b. Se ha descrito asociado a casos de fallos vacunales. Comenzó a ser el predominante a nivel global partir de 2014.	Xiao *et al.*, 2012, 2015, 2016; Seo *et al.*, 2014; Chae, 2015; Eddicks *et al.*, 2015; Franzo *et al.*, 2016a
PCV2e	Genotipo menor. Descrito en EE.UU en muestras de 2006 – 2015.	Davies *et al.*, 2016
PCV2f	Genotipo menor. Descrito en China en muestras de 1996 – 1999.	Bao *et al.*, 2018
PCV2g	Genotipo menor. Propuesto por Franzo y Segalés, 2018.	Franzo y Segalés, 2018
PCV2h	Genotipo menor. Propuesto por Franzo y Segalés, 2018.	Franzo y Segalés, 2018

1.2.4 Resistencia

Una de las principales características del PCV2 es su resistencia en el ambiente, lo cual le puede permitir mantener capacidad infectante, suponiendo un problema para su inactivación en las instalaciones que alojan cerdos. Esta resistencia se da tanto a agentes físicos como químicos.

En primer lugar, la ausencia de envoltura externa y el pequeño tamaño le confieren una gran resistencia a la temperatura. Al ser un virus pequeño, posee una

organización muy simple que le confiere una gran estabilidad (Crowther *et al.*, 2003). Se requiere de una temperatura elevada o una exposición muy prolongada al calor para producir un daño en la cápside proteica y logar su inactivación. De esta forma, la capacidad infectante del PCV2 se mantiene intacta a los 65 ºC y no comienza a reducirse hasta que se alcanzan 70 ºC durante al menos 15 minutos. Para su inactivación completa se considera que se requieren 80 ºC durante al menos 15 minutos (Welch *et al.*, 2006; O'Dea *et al.*, 2008).

En segundo lugar, la ausencia de envoltura externa y el pequeño tamaño también le confieren una gran resistencia a desinfectantes químicos. El PCV2 se mantiene viable en un rango de pH desde 2 hasta 11 (Kim *et al.*, 2009). En estudios *in vitro* se ha testado la eficacia de distintos desinfectantes para inactivar el PCV2, medida como una reducción significativa tras la exposición a la concentración recomendada de cada principio activo (Royer *et al.*, 2001; Martin *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2009). Los desinfectantes que tienen alcohol, clorhexidina, formaldehido o compuestos iodados como agentes activos no son eficaces (Figura 6). Por el contrario, aquellos que en su composición contienen agentes oxidantes, álcalis, amonio cuaternario o una combinación de estos son eficaces para inactivar el PCV2. En cuanto a los desinfectantes con compuestos fenólicos, los resultados son contradictorios: Royer *et al.*, (2001) vieron que eran eficaces, Martin *et al.*, (2008) y Kim *et al.*, (2009) observaron lo contrario.

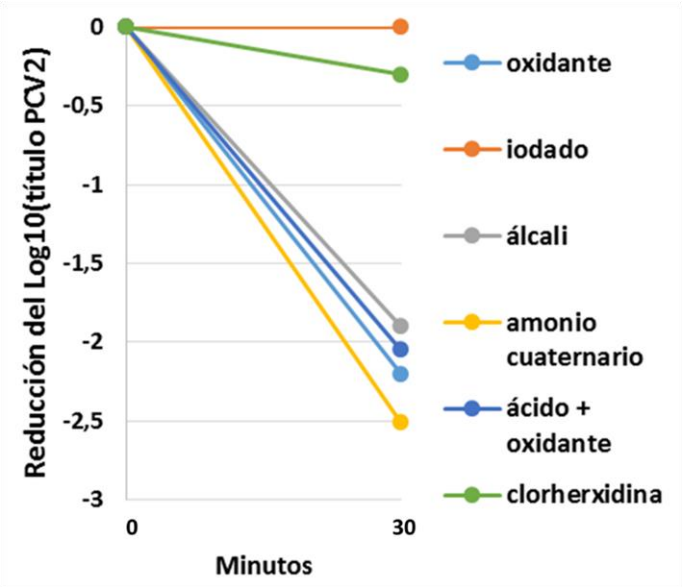


Figura 6. Eficacia *in vitro* de algunos desinfectantes frente a PCV2. Datos de Martin *et al.*, (2008) y Kim *et al.*, (2009)

En condiciones de campo los estudios son más reducidos. En estas situaciones se ha realizado trabajos para comprobar si la desinfección reduce la cantidad de PCV2 en un modelo a escala de un vehículo de transporte de cerdos y en el ambiente de una unidad de aclimatación de nulíparas (Patterson *et al.*, 2011a; Poonsuk *et al.*, 2013). En ambos casos se observó una reducción significativa, aunque en ambos estudios se destaca que la desinfección depende de otras variables como la presencia de materia orgánica, la calidad del agua o la concentración real del desinfectante en la solución utilizada.

1.3 Epidemiología del PCV2

1.3.1 Hospedadores del PCV2

El PCV2 es un virus que presenta una elevada especificidad de hospedador, siendo los cerdos, los jabalíes y los pecaríes sus hospedadores, aunque sólo los dos primeros pueden desarrollar alguna enfermedad asociada a la infección (Segalés y Domingo, 2002; Schulze *et al.*, 2004; de Castro *et al.*, 2014). Los humanos, el ganado vacuno, el ovino, el caprino, el equino y el cunícola no son susceptibles (Allan *et al.*, 2000; Ellis *et al.*, 2000a; Ellis *et al.*, 2001; Quintana *et al.*, 2002). No obstante, se debe mencionar que en condiciones experimentales se ha logrado infectar a terneros que acabaron desarrollando viremia de PCV2 y lesiones en los órganos linfoides (Halami *et al.*, 2014).

Recientemente también se ha detectado ADN de PCV2 en órganos de animales de peletería (Song *et al.*, 2019); no obstante, todavía no se han realizado estudios que detectasen viremia ni respuesta inmunitaria en los mismos. Así, se cree que el virus hallado en esos animales pudo proceder de la alimentación con productos de origen porcino que contenían PCV2 (Zhai *et al.*, 2019).

Los roedores merecen una mención aparte porque, en condiciones experimentales, se han infectado e incluso se ha llegado a transmitir la infección entre ratones. No obstante, no hay un consenso en cuanto a esta información, ya que otros estudios mostraron resultados opuestos (Quintana *et al.*, 2002; Csagola *et al.*, 2008; Opriessnig *et al.*, 2009a). En condiciones de campo se ha detectado ADN de PCV2 en muestras de roedores presentes en granjas de cerdos, no así en los capturados en los alrededores, aunque nunca se ha demostrado que puedan transmitir PCV2 a los cerdos (Lörincz *et al.*, 2010; Pinheiro *et al.*, 2013; Zhai *et al.*, 2016). También se ha detectado ADN de PCV2 en moscas de granjas de cerdos, las cuales se sabe que no son susceptibles de infectarse pero sí pueden portar el virus (Blunt *et al.*, 2011).

1.3.2 Distribución geográfica de la infección por PCV2

Se considera que el PCV2 tiene una distribución global, siendo un virus ubicuo presente en prácticamente todas las granjas de cerdos (Figura 7) (Segalés *et al.*, 2005a; Gillespie *et al.*, 2009; Grau-Roma *et al.*, 2011; Afolabi *et al.*, 2017; Barman *et al.*, 2018; Oba *et al.*, 2020). Esta distribución mundial se debe a la intensificación de la producción porcina y al comercio internacional de cerdos, los cuales en caso de estar infectados contribuyeron a diseminar el patógeno (Schmoll *et al.*, 2008; Vidigal *et al.*, 2012). El movimiento de cerdas de determinadas líneas genéticas para los centros de producción de porcino, los cuales son la base del tejido productivo, se considera el

principal motivo de la rápida expansión del PCV2 y de los cambios en sus genotipos predominantes cada cierto tiempo.



Figura 7. Países en los que se ha detectado la infección por PCV2 (en verde).

1.3.3 Dinámica de la infección

Tradicionalmente, la Enfermedad Sistémica por PCV2 (PCV2-SD) se ha utilizado como modelo para el estudio de la dinámica de los diferentes procesos asociados al PCV2, ya que ha sido la principal enfermedad causada por este patógeno (Larochelle *et al.*, 2003; Sibila *et al.*, 2004).

1.3.3.1 Dinámica característica de la infección por PCV2

En granjas con cerdos no vacunados lo más habitual es que la infección ocurra a partir de las 8 – 10 semanas de vida de los animales, coincidiendo aproximadamente con el final de la fase de transición (Rose *et al.*, 2012). A edades más tempranas, la cantidad de anticuerpos maternales es más elevada, motivo por el cual los lechones no son susceptibles (Mckeown *et al.*, 2005; Dvorak *et al.*, 2018). No obstante, a partir de las 8 – 10 semanas de edad, la protección conferida por los anticuerpos maternales se vuelve insuficiente para evitar la infección (Rodríguez-Arrioja *et al.*, 2002; Opriessnig *et al.*, 2004a).

Los primeros cerdos infectados contagian la infección de forma exponencial entre sus compañeros. Esto, unido a una viremia persistente (en torno a 70 días), hace que a nivel de granja el pico de infección se observe entre el final de transición y la primera mitad de la fase de cebo, decayendo gradualmente a partir de ese momento (Figura 8) (Shibata *et al.*, 2003; Rose *et al.*, 2012). Además, el manejo intensivo y la facilidad de

transmisión de este virus hacen que al finalizar la etapa de cebo prácticamente el 100 % de los animales se hayan infectado (Puvanendiran *et al.*, 2011).

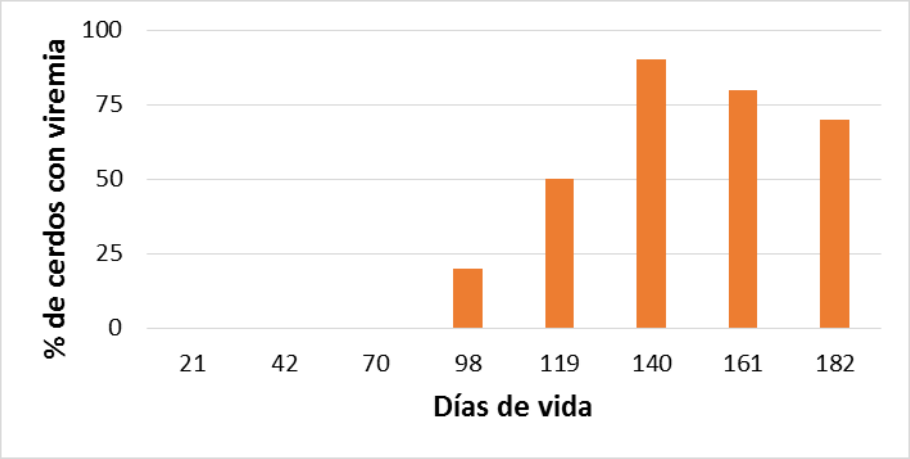


Figura 8. Ejemplo de la dinámica de infección por PCV2 en una granja de cerdos sin vacunar. Adaptado de Fraile *et al*. (2012a).

El pico de infección coincide con la edad en la que se ha descrito la PCV2-SD. Cuando la infección por PCV2 provoca PCV2-SD, la morbilidad de ésta puede oscilar entre el 4 y el 30 %, dependiendo de la granja y de la banda de producción, con una letalidad de un 70 – 80 % (Madec *et al.*, 2000; Segalés y Domingo, 2002). En estos casos, la viremia de PCV2 es mayor que en los casos donde la infección cursa de forma asintomática (Larochelle *et al.*, 2003; Brunborg *et al.*, 2004; Grau-Roma *et al.*, 2009). No obstante, debido a la naturaleza multifactorial de los casos de enfermedad (necesidad de coinfecciones, razas presentes, prácticas de manejo…) no se ha podido establecer un valor umbral de viremia.

Asimismo, en granjas con casos de PCV2-SD, la proporción de cerdos infectados es mayor (Sibila *et al.*, 2004). Además, también se ha descrito que en estas situaciones es habitual los lechones se infecten a una edad más temprana, en torno a las 7 semanas de vida (Rose *et al.*, 2003). No obstante, a pesar de estas ligeras diferencias, la dinámica de la infección y de su respuesta serológica es prácticamente igual en los casos asintomáticos y con enfermedad (Larochelle *et al.*, 2003; Grau-Roma *et al.*, 2009).

En el caso de las cerdas reproductoras la información es contradictoria. En trabajos realizados en España antes del uso de vacunas frente a PCV2, se indica que el porcentaje de cerdas con viremia es inferior al 10 % (Rodríguez-Arrioja *et al.*, 2002; Calsamiglia *et al.*, 2007). No obstante, en estudios llevados a cabo en Estados Unidos se indica que en algunas granjas el porcentaje de cerdas infectadas puede oscilar entre el 30 y el 100 % (Shen *et al.*, 2010; Dvorak *et al.*, 2013). Posiblemente en esta diferencia influyen las condiciones productivas de cada país, por ejemplo, granjas con un gran número de cerdas reproductoras en EE.UU. y más pequeñas en España.

La dinámica de la infección por PCV2 se puede alterar si las cerdas reproductoras se infectan en el periparto. En estas situaciones es posible una excreción de PCV2 a través de la leche y por tanto la inmunidad maternal de sus lechones es menos duradera, al infectarse más tempranamente (Gerber *et al.*, 2011). En cualquier caso, en condiciones naturales la gran mayoría de cerdas son seropositivas a PCV2 (Rodríguez-Arrioja *et al.*, 2002; Shen *et al.*, 2010; Dvorak *et al.*, 2013; Oliver-Ferrando *et al.*, 2018a) y, salvo casos puntuales, se considera que su exposición previa a este patógeno les proporciona una inmunidad suficiente contra reinfecciones (Eddicks *et al.*, 2018).

En el caso de los verracos, en un estudio que se analizaron muestras de suero de 674 animales se comprobó que el 60% eran seropositivos a PCV2. Asimismo, se ha indicado que la infección en estos animales sigue la dinámica habitual (a final de transición y durante la fase de crecimiento). De hecho, debido a viremias prolongadas es más probable que los verracos menores de 16 meses excreten PCV2 a través del semen que los de mayor edad (McIntosh *et al.*, 2006a; Schmoll *et al.*, 2008).

1.3.3.2 Dinámica reciente de la infección por PCV2

En los últimos años diferentes aspectos epidemiológicos de la infección por PCV2 han evolucionado debido a la presión que ejerce el uso extendido de la vacunación, la cual en algunos países puede conllevar la vacunación de toda la cabaña porcina (Segalés, 2015). En situaciones con una adecuada pauta vacunal, respecto a la dinámica tradicional, el momento de infección por PCV2 se retrasa hasta coincidir aproximadamente con el último tercio de la fase de cebo (Figura 9). Además, la vacunación continuada ha provocado que la presión de infección por PCV2 en las granjas sea bastante reducida, motivo por el que la proporción de cerdos infectados es significativamente menor a la que se observaba tradicionalmente (Haake *et al.*, 2014; Feng *et al.*, 2016).

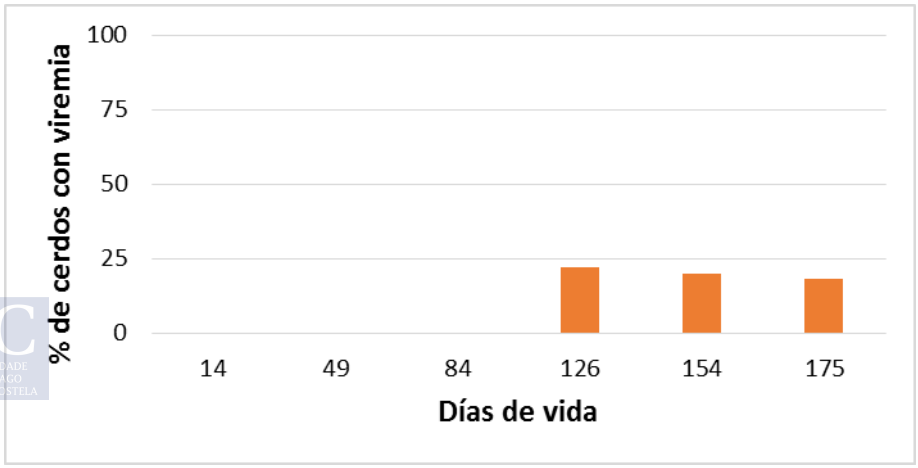


Figura 9. Ejemplo de la dinámica de infección por PCV2 en una población de cerdos vacunados. Adaptado de Feng *et al*. (2016).

No obstante, este cambio en la epidemiología implica que las cerdas reproductoras estén menos expuestas al PCV2 a lo largo de su vida productiva. De hecho, en trabajos recientes se ha notificado que la seroprevalencia en las cerdas adultas es menor del 30 % (Eddicks *et al.*, 2016; Dieste-Pérez *et al.*, 2018). En estas situaciones es posible que el retraso del momento de infección conlleve que algunas cerdas de reposición estén infectadas a la edad de la cubrición (≈ 230 – 240 días de vida), pudiendo darse casos de alteraciones reproductivas, el nacimiento de lechones infectados o incluso que infecten otras reproductoras si la inmunidad de éstas es insuficiente (Madson y Opriessnig, 2011) (Figura 10). También es posible que la inmunidad que las cerdas transfieren a su descendencia sea menor, siendo sus lechones más susceptibles. Así, es posible que puntualmente en algunas granjas se puedan observar casos de infecciones tempranas en lechones al inicio de la etapa de transición (Calsamiglia *et al.*, 2007; Chae, 2012b; Figueras *et al.*, 2016).

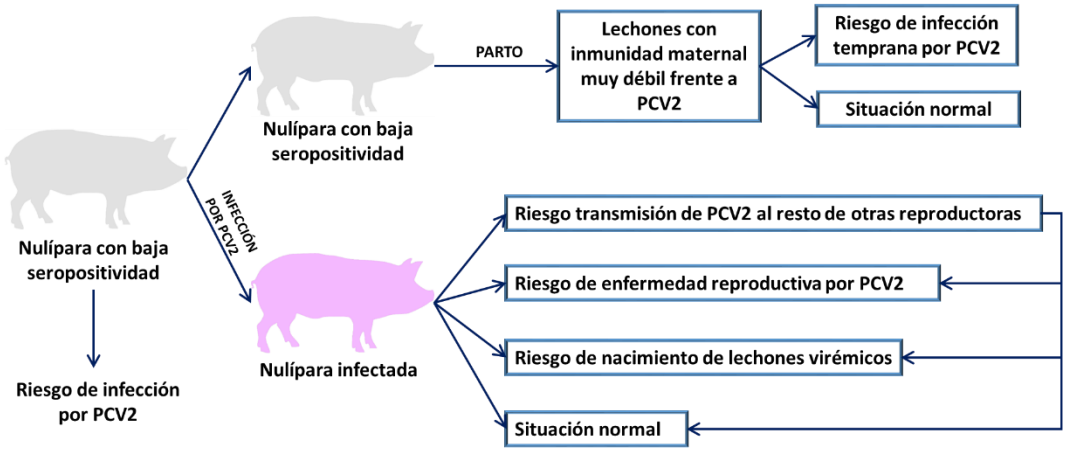


Figura 10. Esquema de posibles situaciones en la dinámica actual de la infección por PCV2 en granjas que incluyen al PCV2 en el programa vacunal de los lechones.

Por tanto, es posible que en determinadas granjas este cambio epidemiológico conlleve la aparición de los denominados "fallos vacunales". Es decir, situaciones en las que la vacunación frente a PCV2 pierde parte de su eficacia, o bien que la dinámica de la infección vuelva a su presentación natural, pudiendo incluso diagnosticarse casos de PCV2-SD en granjas que sí vacunan. Estas situaciones atribuidas a "fallos vacunales" suelen deberse a que se puedan estar vacunando lechones ya infectados, con niveles demasiado elevados de anticuerpos maternales que bloqueen la acción de las vacunas o incluso que la vacunación se realice demasiado tarde (Segalés, 2016). En estas situaciones, es necesario revisar y readaptar el protocolo vacunal frente a PCV2 para corregir la situación.

1.3.4 Transmisión del PCV2

Como cualquier otro patógeno, la transmisión del PCV2 depende de la susceptibilidad del hospedador, de la capacidad infectante del virus y de que la exposición del hospedador al virus sea favorable para la infección (tiempo de exposición, dosis infectiva…) (Thrusfield, 2008). Ser un virus que se considera presente en prácticamente todas las granjas, que alcanza elevados porcentajes de infección en casos sin vacunar, y que tras años de vacunación no se ha logrado erradicar en ninguna granja comercial, confirman que el PCV2 se transmite de forma muy eficiente.

En general, se ha estimado que el ratio de reproducción (R_0) para esta infección es de 5,9 y que el tiempo medio de generación de enfermedad (d_T) (tiempo para que un cerdo recién infectado contagie a otro susceptible) es de 18,4 días (Andraud *et al.*, 2009a). Sin embargo, estos parámetros oscilan ligeramente dependiendo del grado de contacto entre cerdos y de los días tras la infección. En condiciones experimentales, el R_0 entre cerdos en una misma cuadra alcanza un valor de 8,9, mientras que entre animales en distintos corrales se reduce a 1,2 (Andraud *et al.*, 2008); además, la transmisión es más eficiente entre los 8 y los 15 post-infección, disminuyendo a partir de ese momento, aunque aún pueden permanecer infectantes hasta los 42 días post-infección (Bolin *et al.*, 2001; Andraud *et al.*, 2009a).

Este virus se excreta en gran cantidad y por numerosas vías, habiéndose detectado mediante PCR en los fluidos indicados en la Figura 11 (Madson *et al.*, 2008; Grau-Roma *et al.*, 2009; Patterson *et al.*, 2011b; Dvorak *et al.*, 2013). Esta excreción tan por múltiples vías influye en los parámetros mencionados en el párrafo anterior, pues la contaminación de superficies en las que están en contacto cerdos alojados conjuntamente es una vía que contribuye a su contagio.

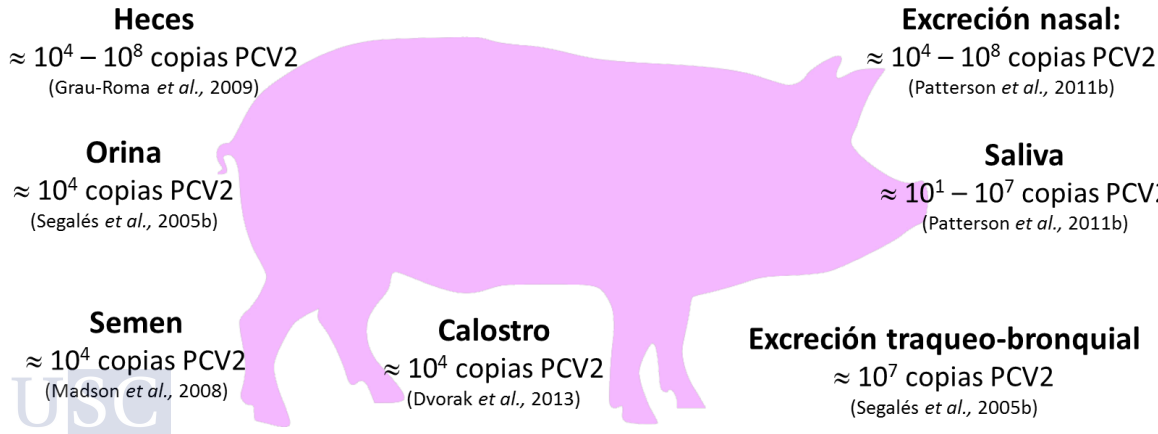


Figura 11. Fluidos en los que se puede excretar PCV2 y cantidad aproximada en cerdos no vacunados.

En cerdos que no han sido vacunados frente a PCV2, el pico de excreción se alcanza aproximadamente a los 15 días post-infección y desciende significativamente a partir

de los 35 días (Patterson *et al.*, 2011b). No obstante, esta excreción puede ser muy duradera, habiéndose detectado en muestras de leche hasta el día 27 de lactación, en semen hasta 47 días post-infección y en heces e hisopos nasales desde los 28 hasta los 209 días de vida (Larochelle *et al.*, 2000; Ha *et al.*, 2009; Patterson *et al.*, 2011c). También se ha visto que la excreción es mayor en los cerdos con PCV2-SD que en los infectados de forma subclínica (Segalés *et al.*, 2005b); en cambio, en cerdos vacunados la excreción es más reducida y de menor duración (Fort *et al.*, 2008; Opriessnig *et al.*, 2011a; Seo *et al.*, 2012).

1.3.4.1 Transmisión horizontal

El hecho de que el PCV2 pueda ser excretado por varias rutas, sumado a que presenta una gran resistencia en el ambiente, hace que su transmisión horizontal sea muy eficiente. Se considera que la vía naso – oral y la fecal – oral son las principales vías de transmisión del PCV2 (Segalés *et al.*, 2005a; Rose *et al.*, 2012).

La principal forma de transmisión de PCV2 es el contacto directo entre cerdos infectados y susceptibles. Se ha visto que el contacto entre ambos favorece la transmisión de la infección y la aparición de signos clínicos, siendo más eficiente si los cerdos están en contacto directo que si se interpone algún elemento físico (Andraud *et al.*, 2008; Dupont *et al.*, 2009; Kristensen *et al.*, 2009).

Se ha sugerido que la excreción de PCV2 a través de la leche podría ser el origen de la infección que ocurre tras el descenso de la inmunidad maternal. Esta hipótesis se basa en que el PCV2 quedaría latente en el organismo del lechón y se reactivaría una vez que la inmunidad maternal desciende (Madson y Opriessnig, 2011). Se ha comprobado que, al menos en fetos, las células del timo pueden estar infectadas de forma latente (Sydler *et al.*, 2016). No obstante, esta hipótesis no se ha podido confirmar ya que se ha comprobado que tras un destete precoz (a los 10 – 12 días de vida) y el traslado de esos lechones a unas condiciones controladas, éstos no se infectaron hasta las 15 semanas de edad, momento en que finalizó el estudio (Opriessnig *et al.*, 2004a).

La excreción de PCV2 a través del semen es intermitente y, en base a la información hasta la fecha, insuficiente para infectar a las cerdas o a los embriones mediante inseminación artificial; no obstante podría tener repercusión en casos de monta natural, pues la concentración viral es mayor que en las dosis seminales (Madson *et al.*, 2009a; 2009b).

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Por otro lado, en los pocos estudios que se ha estudiado el PCV2 en muestras cuyo origen no son los cerdos se sugiere que varios elementos que pueden participar en una transmisión indirecta. Así, Verreault *et al.*, (2010) detectaron PCV2 en el aire de las granjas y sugieren que la transmisión aerógena del PCV2 podría ser factible al inhalar una cantidad elevada de PCV2. Esta hipótesis la confirmaron Kristensen *et al.*, (2013),

quienes comprobaron que cerdos sin signos clínicos enfermaban al estar expuestos al aire procedente de salas con cerdos con PCV2-SD. Además, la detección del PCV2 en insectos y roedores podría ser un riesgo de transmisión en caso de ingestión de estos animales por parte de cerdos susceptibles a la infección (Opriessnig *et al.*, 2009a).

Por otra parte, en otros virus como el del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (PRRS), la Influenza A y el virus de la Diarrea Epidémica Porcina (DEP) se ha demostrado una transmisión indirecta a través de fómites y personas (Otake *et al.*, 2002a; Pitkin *et al.*, 2009a; Allerson *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2017). Teniendo en cuenta la estabilidad del PCV2 en el ambiente y su transmisión eficiente (Rose *et al.*, 2003), parece que esta situación también se dé con esta infección, si bien esta situación aún no ha sido demostrada.

1.3.4.2 Transmisión vertical

La transmisión transplacental del PCV2 se ha demostrado en estudios experimentales al inocular a cerdas gestantes por vía nasal y provocar el nacimiento de lechones infectados (Park *et al.*, 2005). En condiciones de campo, se ha notificado el nacimiento de lechones virémicos procedentes de cerdas también infectadas; además, parte de esos lechones eran seropositivos y otros seronegativos, indicando que la infección se puede producir antes y después de que los fetos sean inmunocompetentes, (Shen *et al.*, 2010).

No obstante, en los casos en los que se produce la transmisión por vía vertical lo habitual es que se observe alguna alteración reproductiva a nivel de granja, como un incremento de lechones nacidos muertos, momificados o camadas reducidas (Madson y Opriessnig, 2011; Oropeza-Moe *et al.*, 2017). En camadas sin alteraciones, se ha visto que el nacimiento de lechones infectados es prácticamente testimonial (Eddicks *et al.*, 2016; Dieste-Pérez *et al.*, 2018).

1.3.5 Factores que favorecen el desarrollo de las enfermedades asociadas a la infección por PCV2

Una de las principales características que muestran las enfermedades asociadas a la infección por PCV2 es su condición multifactorial (Segalés y Domingo, 2002).. Diversos cofactores como el genotipo del virus, la susceptibilidad del hospedador, las coinfecciones con otros patógenos y modulación del sistema inmune influyen decisivamente en la presentación y severidad de la enfermedad clínica (Opriessnig *et al.*, 2007).

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.3.5.1 Factores relacionados con el virus

Los distintos genotipos de PCV2 parecen tener distinta virulencia. De hecho, coincidiendo con el cambio de genotipo predominante, tanto de PCV2a a PCV2b como de PCV2b a PCV2d hubo incrementos de brotes de PCV2-SD y aumentos de la virulencia del virus (Carman *et al.*, 2008; Cortey *et al.*, 2011a; Guo *et al.*, 2012). Durante la sustitución de PCV2b por PCV2d se llegó a plantear que la vacunación frente a PCV2 no garantizaba protección frente al nuevo genotipo (Opriessnig *et al.*, 2013; Seo *et al.*, 2014a). No obstante, estudios posteriores mostraron que las vacunas disponibles también eran eficaces frente a este nuevo genotipo (Opriessnig *et al.*, 2014a, 2014b), siendo posible que otra variable interfiera en los fallos descritos.

Además, cualquier pequeño cambio que ocurra en el genoma del PCV2 debido a mutaciones puntuales puede provocar un cambio en la virulencia del virus. Por ejemplo, Fenaux *et al.*, (2004a) observaron que un PCV2 aislado de cerdos con PCV2-SD sufrió dos mutaciones en el gen que codifica para la cápside después de 120 pases en cultivos celulares. Los cerdos inoculados con esta nueva cepa mostraron menor viremia y lesiones menos severas que los inoculados con la cepa original.

1.3.5.2 Factores relacionados con el hospedador

El peso al nacimiento y el sexo de los lechones fueron los primeros factores de riesgo para desarrollar PCV2-SD que se identificaron (Corrégé *et al.*, 2001). Los lechones con menor peso al nacimiento, al destete y al inicio de cebo eran más propensos a enfermar; asimismo, la PCV2-SD se observaba en más casos en los machos castrados que en las hembras (38 % *vs* 29 % respectivamente). Sin embargo, respecto a esto último, los autores también puntualizaron que otras variables como una mala praxis durante la castración podría interferir en dicha observación.

Todas las razas y líneas genéticas de cerdos son susceptibles a la infección por PCV2. No obstante, se considera que los cerdos de la raza Landrace son más susceptibles para padecer PCV2-SD que los de las razas Duroc, Large White y Pietrain (Opriessnig *et al.*, 2006a; 2009b). También se ha descrito que los lechones con línea paterna Large White x Duroc muestran mayores tasas de mortalidad asociada a PCV2-SD que los procedentes de verracos Large White x Pietrain y estos, a su vez, que los procedentes de Pietrain x Pietrain (López-Soria *et al.*, 2004). En cambio, en otro trabajo se comprobó que al cambiar la raza de verraco habitual por un Pietrain no influía en la aparición de casos de PCV2-SD en las granjas (Rose *et al.*, 2004). Estos resultados contradictorios respecto a la raza pura Pietrain pudieron deberse a otras variables involucradas y no evaluadas. La apreciación general de los veterinarios de campo es que utilizar diferentes razas conlleva un incremento o disminución de los cuadros clínicos asociados a PCV2 en una misma granja (Vidal, 2020).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

La inmunidad maternal es otro factor que favorece el desarrollo de la PCV2-SD. Ya en las primeras descripciones se sospechaba de un "efecto camada" por el cual los lechones de ciertas cerdas eran más propensos para enfermar (Madec *et al.*, 2000). Estudios posteriores comprobaron que la protección frente a la infección por PCV2 dependía del título de los anticuerpos maternales: a mayor título, mayor protección. De esta forma, los lechones procedentes de cerdas con bajo nivel de anticuerpos son más propensos para desarrollar PCV2-SD que los procedentes de cerdas con un nivel medio-alto (Mckeown *et al.*, 2005; Calsamiglia *et al.*, 2007).

1.3.5.3 Coinfecciones con otros patógenos

En general las granjas con PCV2-SD sufren de más patologías que las no afectadas (Ellis *et al.*, 2004). Así, se ha detectado una gran variedad de patógenos en cerdos con PCV2-SD (Tabla 3). Algunos son agentes cuya coinfección favorece la PCV2-SD, mientras que otros aparecen en casos concretos a consecuencia de la inmunosupresión debida a dicha enfermedad (Segalés *et al.*, 2013).

Tabla 3. Principales virus y bacterias detectados en casos de Enfermedad Sistémica por PCV2 (PCV2-SD).

Patógeno		Observaciones	Referencias
Virus	Virus del PRRS	Coinfección más habitual con el PCV2 en casos de PCV2-SD. Su presencia favorece la replicación de PCV2, agravando el cuadro clínico y la enfermedad.	Pallarés *et al.*, 2001; Pogranichniy *et al.*, 2002; Wellenberg *et al.*, 2004; Grau-Roma and Segalés, 2007
	Parvovirus porcino	Se considera un factor desencadenante de PCV2-SD.	Ellis *et al.*, 2000b; Kim *et al.*, 2002
	Influenza porcina	No incrementa la severidad de la enfermedad, los signos clínicos ni las lesiones asociadas a PCV2.	Wei *et al.*, 2010
	Virus de la Diarrea epidémica porcina	No incrementa la severidad de la PCV2-SD, no obstante la infección previa con PCV2 favorece su replicación.	Jung *et al.*, 2006
	Torque Teno Sus virus	Más habitual en granjas afectadas por PCV2-SD que en las no afectadas. Sin embargo, su prevalencia y carga vírica no está completamente relacionada con PCV2-SD.	Kekarainen *et al.*, 2006; Aramouni *et al.*, 2011
Bacterias	*M. hyopneumoniae*	Se considera desencadenante de PCV2-SD. Se ha notificado que las bacterinas utilizadas en algunas vacunas pueden incrementar la incidencia de PCV2-SD.	Opriessnig *et al.*, 2003; 2004b
	L. intracellularis	Suele estar implicado en el cuadro clínico de la PCV2-SD secundariamente a la inmunosupresión.	Opriessnig y Halbur, 2012
	Salmonella spp.	La infección previa por PCV2 facilita la multiplicación de esta bacteria.	Opriessnig y Halbur, 2012
	Glaserella parauis	Coinfección más frecuente en algunos casos. No es un factor desencadenante de la PCV2-SD.	Kim *et al.*, 2002

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

El virus del PRRS es el principal patógeno cuya coinfección predispone al desarrollo de la PCV2-SD (Rose *et al.*, 2003). De hecho, entre un 52 y un 83 % de los diagnósticos de PCV2-SD, el virus del PRRS está presente (Pallarés *et al.*, 2001; Wellenberg *et al.*, 2004; Opriessnig y Halbur, 2012). Ambos patógenos son inmunosupresores, incrementando la susceptibilidad a otras infecciones. Además, la infección previa por el virus del PRRS favorece la replicación de PCV2 ocasionando viremias más elevadas y lesiones en más órganos (Rovira *et al.*, 2002; Wellenberg *et al.*, 2004).

El parvovirus porcino también se considera desencadenante de la PCV2-SD. Se ha observado que este virus está entre un 18 y un 25 % de los casos de enfermedad asociada a PCV2 (Ellis *et al.*, 2000b; Kim *et al.*, 2002). En estudios experimentales se ha comprobado que los cerdos coinfectados desarrollaban lesiones más graves que los infectados sólo con PCV2 (Opriessnig *et al.*, 2004c). Se ha propuesto que esta coinfección podría estimular la producción de células inmunitarias lo que facilitaría una mayor replicación del PCV2 (Opriessnig y Halbur, 2012).

Mycoplasma hyopneumoniae es la principal bacteria considerada como cofactor desencadenante de la PCV2-SD (Alarcon *et al.*, 2011). Esta bacteria está en el 15 – 35 % de los casos de PCV2-SD (Pallarés *et al.*, 2001; Opriessnig y Halbur, 2012). En un trabajo experimental se comprobó que la infección conjunta por PCV2 y *M. hyopneumoniae* incrementa la severidad de la neumonía y de la PCV2-SD (Opriessnig *et al.*, 2004b). La infección por *M. hyopneumoniae* induce un infiltrado de células inflamatorias en el tejido pulmonar que favorece la replicación de PCV2; la distribución sistémica de parte estas células podría promover la diseminación sistémica del PCV2 y su replicación en otros órganos (Opriessnig *et al.*, 2004b).

Otros patógenos que suelen estar implicados en los casos de PCV2-SD son el virus Influenza, el virus de la DEP, el Torque Teno Sus virus, bacterias como *Lawsonia intracellularis*, *Salmonella* spp., *Glaserella parasuis* y otros microorganismos como *Aspergillus* spp., *Chlamydia* spp. o *Cryptosporidium parvum*. No obstante, a diferencia de los mencionados anteriormente, se considera que éstos aparecen en el cuadro clínico a consecuencia de la inmunosupresión que padecen los cerdos afectados por PCV2-SD (Grau-Roma *et al.*, 2011; Opriessnig y Halbur, 2012; Ouyang *et al.*, 2019).

1.3.5.4 Factores relacionados con el manejo y bioseguridad

En las primeras descripciones de casos de PCV2-SD ya se observó que ciertas prácticas de manejo en algunas granjas favorecían su desarrollo (Madec *et al.*, 2000). En estudios posteriores se evaluaron y compararon más variables (tamaño, ubicación respecto a otras granjas de cerdos…) entre granjas afectadas y no afectadas por PCV2-SD (Rose *et al.*, 2003, 2009; López-Soria *et al.*, 2005; Dewey *et al.*, 2006; Woodbine *et*

al., 2007; Andraud *et al.*, 2009b; Alarcon *et al.*, 2011). Por otro lado, las malas praxis vacunales frente a PCV2 (vacunación temprana o tardía, mala conservación de las vacunas…) también incrementan el riesgo de padecer PCV-SD a pesar de utilizar la vacunación como medida preventiva (Segalés, 2016). En la Tabla 4 se indican los principales factores de bioseguridad y de manejo que influyen en el riesgo de desarrollar PCV2-SD.

Tabla 4. Factores de bioseguridad y manejo que influyen en el riesgo de padecer PCV2-SD.

	Factores que incrementan el riesgo de padecer PCV2-SD	Factores que reducen el riesgo de padecer PCV2-SD
Bioseguridad	• ≤ 3,2 km de granja con PCV2-SD • Fosa de purín común para varias salas con cerdos	• Uso de duchas al entrar a la granja • Visitantes sin contacto con granjas de cerdos durante al menos 3 días • Cambio de ropa/calzado en vestuario • Cuarentena a las cerdas de reposición
Manejo	• Censo ≥ 600 cerdas reproductoras • Porcentaje de adopciones ≥ 15% • Destete temprano (< 21 días) y de lechones con menos de 4 kg • Corrales grandes en transición y cebo (>7,8 m^2) • Lechones de distintas camadas en mismos corrales • Cerdas con lesiones en cuello por mala praxis (vacunación separada frente a *Erysipela* y parvovirus) • Mezcla de cerdos "cola" con lechones de nueva introducción • Lazaretos mal aislados y constantemente ocupados • Mala praxis vacunal frente a PCV2	• Manejo todo dentro – todo fuera con vacíos sanitarios de al menos 4 días • Reposición propia • Uso de semen de centros de inseminación • Gestaciones grupales • Tratamiento frente a parasitosis externas • Uso de oxitocina durante el parto • Adicción de plasma al pienso lactoiniciador • Separación de sexos al destete • Uso de piensos con distinta composición según fase productiva

1.3.5.5 Modulación del sistema inmune

En estudios experimentales se ha comprobado que la inoculación de PCV2 con inmunoestimulantes como el *keyhole limpet hemocyanin* (KLH) y el Baypamun® favorece el desarrollo de la PCV2-SD, a diferencia de la inoculación sola del virus (Krakowka *et al.*, 2001; Kyriakis *et al.*, 2002). Además, en los primeros años que se diagnosticaban casos de PCV2-SD también notificó que las bacterinas utilizadas en las vacunas frente a *M. hyopneumoniae* tendían a incrementar la incidencia de PCV2-SD (Opriessnig *et al.*, 2003). Este es el motivo por el que algunos técnicos de porcino prefieren adelantar la vacunación frente a *M. hyopneumoniae* a la primera semana de

vida, minimizando la estimulación del sistema inmune y dificultando la replicación de PCV2 (Chae, 2012b).

En general, los adyuvantes utilizados en algunas vacunas distintas a las de PCV2 no incrementan la replicación de PCV2 (Resendes *et al.*, 2004). No obstante, en condiciones experimentales se ha descrito que los adyuvantes oleosos estimulan la replicación del virus, dando lugar a mayores viremias y lesiones que las observadas cuando se utilizan adyuvantes acuosos o con hidróxido de aluminio (Hoogland *et al.*, 2006). A pesar de esta observación, en condiciones de campo no se conocen casos de esta apreciación, pudiendo ser imperceptibles.

Por otro lado, la inmunosupresión provocada por el tratamiento con dexametasona en cerdos puede incrementar la gravedad de la inflamación granulomatosa en los tejidos linfoides (Kawashima *et al.*, 2003).

1.4 Patogenia de la infección por PCV2

1.4.1 Células y tejidos diana del PCV2

El PCV2 tiene diferente tropismo celular durante la vida embrionaria/fetal y después del nacimiento de los lechones.

1.4.1.1 Embriones y fetos

Si la infección de las cerdas se produce durante la gestación es posible que el PCV2 alcance a los embriones o a los fetos mediante transmisión transplacentaria (Park *et al.*, 2005).

Los embriones son refractarios a la infección mientras estén recubiertos por la zona pelúcida. Una vez que ésta desaparece, el virus se puede replicar en la mórula y los blastocistos ocasionando la muerte y la reabsorción de los embriones (Mateusen *et al.*, 2007; Nauwynck *et al.*, 2012).

Cuando la infección ocurre durante la fase fetal, la replicación del PCV2 es mayor si el virus alcanza a los fetos antes del día 75 de gestación; a partir de ese momento son inmunocompetentes y la replicación es más reducida (Sánchez *et al.*, 2001). En los fetos el PCV2 se replica principalmente en el corazón y en menor medida en el hígado, los tejidos linfoides y los pulmones (Sánchez *et al.*, 2003). Como consecuencia se produce un daño cardíaco que puede provocar la muerte y posterior momificación del feto (Pensaert *et al.*, 2004).

1.4.1.2 Lechones y cerdos

En los lechones y los cerdos adultos se considera que la replicación ocurre en los tejidos linfoides más próximos a la vía de entrada del virus (Yu *et al.*, 2007). No obstante, no hay un consenso general sobre cuál es el tipo celular en el que el PCV2 se replica mayormente. Algunos autores sostienen que las células diana son los linfocitos, mientras que otros sostienen que son células de la línea monocito – macrófago (Rosell *et al.*, 1999; Sánchez *et al.*, 2003; Pérez-Martín *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2007).

Además, el PCV2 también se puede replicar en los linfocitos B y T sanguíneos. Esto, junto a la capacidad del virus de persistir en células dendríticas sin perder poder infectante (Vincent *et al.*, 2003), facilita su diseminación por todo el organismo y posterior replicación en otros tejidos linfoides, en células del epitelio bronquial y bronquiolar, del epitelio renal, epitelio del colon, células endoteliales, hepatocitos y células glandulares gástricas y pancreáticas (Pérez-Martín *et al.*, 2007).

De esta forma, el PCV2 se puede detectar en prácticamente cualquier órgano de un cerdo infectado aunque, debido a su preferencia por células linfocitarias, los órganos linfoides son en los que se detecta la mayor cantidad. De hecho, se ha estimado que la concentración de PCV2 en los ganglios linfáticos es entre 10^2 y 10^4 veces superior a la detectada en la sangre (Segalés *et al.*, 2005b). Por tanto, el daño que provoca en prácticamente todos los sistemas del organismo hace que el cuadro clínico sea muy amplio.

1.4.2 Replicación del PCV2

El PCV2 utiliza como receptores celulares los glicosaminoglucanos de heparán sulfato y condroitín sulfato presentes en la membrana de las células (Dhindwal *et al.*, 2019). A continuación se transfiere hacia el citoplasma celular a través de un mecanismo de endocitosis (Nauwynck *et al.*, 2012). Una vez en el citoplasma, el PCV2 se libera del endosoma mediante mecanismos que van desde una acidificación hasta un bloqueo en el cambio de pH, dependiendo del tipo de célula infectada (Nauwynck *et al.*, 2012).

Posteriormente, el ADN del PCV2 se transporta al núcleo de la célula, donde las Rep, Rep' y Cap son transcritas y las proteínas son sintetizadas e importadas desde el citoplasma. Posteriormente tiene lugar la elongación del ADN del PCV2 y el ensamblaje del virus, acciones para las que se sirve de enzimas de la célula hospedadora presentes en la fase S del ciclo celular (Tischer *et al.*, 1987; Finsterbusch y Mankertz, 2009). Finalmente, se liberan los viriones e infectan a otras células susceptibles siguiendo el mismo mecanismo.

1.4.3 Inmunosupresión debida a la infección por PCV2

La alteración del sistema inmune es la principal característica en los cerdos infectados por PCV2. A causa del daño provocado en los órganos linfoides, es posible que en estos se reduzca el número de linfocitos, provocando una depleción linfoide. Esta depleción linfoide depende de la cantidad de PCV2 en el tejido linfoide: a mayor cantidad de virus, mayor depleción (Darwich *et al.*, 2002). A consecuencia de esta alteración surge una linfopenia detectable a los 7 – 10 días post-infección (Nielsen *et al.*, 2003). Esta linfopenia afecta principalmente a los linfocitos de la línea T, y en menor medida a los de la línea B, y está acompañada de una disminución de células Natural Killer (NK), motivos por los que en los cerdos con PCV2-SD la respuesta inmune celular está disminuida (Darwich *et al.*, 2002; Chianini *et al.*, 2003).

En cambio, a consecuencia del cuadro inflamatorio se incrementa la concentración de macrófagos en los tejidos, observándose inflamaciones granulomatosas (Chianini *et al.*, 2003). De esta forma, la infección por PCV2 provoca una inmunodeficiencia que complica el cuadro clínico en los cerdos infectados e incrementa la susceptibilidad y gravedad de infecciones secundarias (Segalés *et al.*, 2004a).

1.4.4 Infección por PCV2 y respuesta inmune del organismo

1.4.4.1 Viremia

La viremia de PCV2 tiene un papel fundamental en el desarrollo de las enfermedades asociadas a la infección por PCV2 (Figura 12). Por lo general, cuanto mayor es la cantidad de PCV2 a la que se exponen los cerdos, mayor es la viremia que acaban sufriendo (Dupont *et al.*, 2009; Kristensen *et al.*, 2013). De hecho, viremias elevadas (más $10^{6,21}$, 10^{7} copias/ml) se suelen asociarse, aunque no siempre, al desarrollo de PCV2-SD (Brunborg *et al.*, 2004; Grau-Roma *et al.*, 2009).

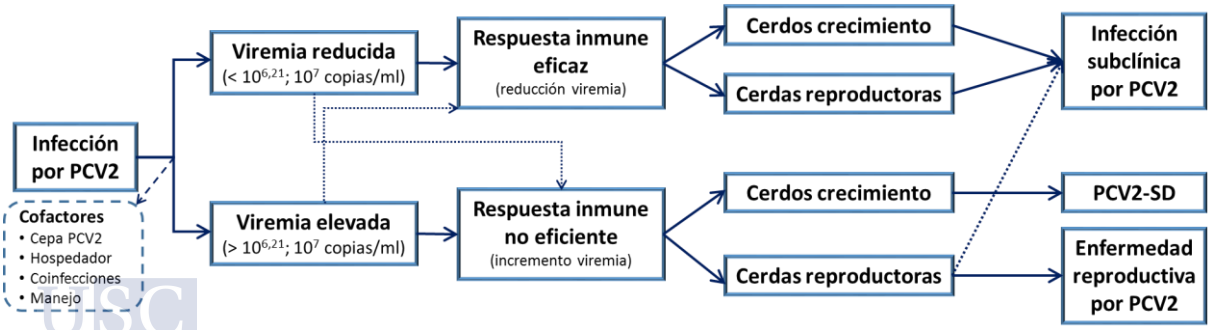


Figura 12. Modelo de la progresión de la infección por PCV2. Las líneas continuas indican eventos probables; las discontinuas indican eventos menos probables. Modificado de Opriessnig *et al.*, (2007).

Tras la infección por PCV2 se produce un periodo de incubación de aproximadamente una semana, coincidente con la replicación primaria en tejidos como las tonsilas y/o las placas de Peyer. Posteriormente, la diseminación sistémica y la replicación en varios órganos provocan un pico de viremia a los 11 – 20 días post-infección (Andraud *et al.*, 2008, 2009a; Patterson *et al.*, 2011c). A partir de ese momento, en cerdos con una respuesta inmune adecuada, la infección comienza a disminuir gradualmente aunque la viremia suele ser de larga duración (Figura 13). De hecho, se han confirmado viremias de hasta 200 días (Patterson *et al.*, 2011b).

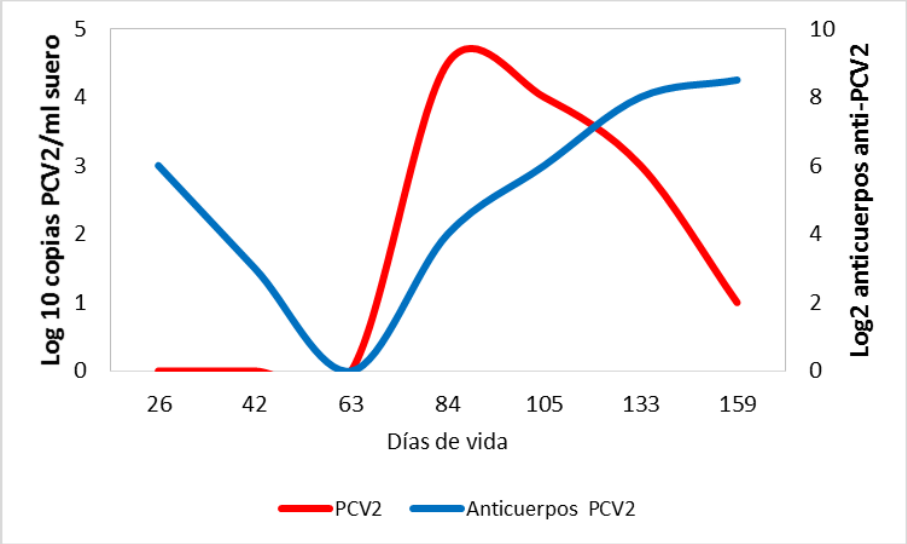


Figura 13. Evolución de la viremia y la respuesta inmune humoral tras la infección por PCV2. Origen datos: estudios propios realizados en la Facultad de Veterinaria de Lugo.

En los cerdos que han sido vacunados frente a PCV2, la protección vacunal retrasa la edad a la que los lechones son susceptibles de infectarse y, tanto en lechones como en cerdas reproductoras, disminuye la viremia y su duración (Chae, 2012a).

En el caso de transmisión vertical, la cantidad de PCV2 en el suero y los órganos de los fetos será mucho mayor si la infección se produce antes de que éstos sean inmunocompetentes. Si el feto se infecta después del día 75 de gestación la detección de PCV2 es más frecuente en el corazón, los pulmones o el hígado (Pensaert *et al.*, 2004).

1.4.4.2 Respuesta inmune humoral a la infección por PCV2

Tras la infección por PCV2, el organismo de los cerdos genera una respuesta inmune humoral que se manifiesta en una seroconversión aproximadamente a los 14 – 21 días post-infección (Figura 13) (Fort *et al.*, 2007; Grau-Roma *et al.*, 2009; Csank *et al.*, 2013).

Tras la infección se producen IgM que alcanzan su máxima concentración aproximadamente a los 10 días post-infección (Meerts *et al.*, 2006). En ese momento, se incrementa de forma exponencial la producción de IgG, que alcanzan su pico a las 6 – 8 semanas post-infección y después comienzan a descender de forma paulatina, aunque se mantienen durante al menos 20 semanas (Rodríguez-Arrioja *et al.*, 2002; Carasova *et al.*, 2007). Estas IgG son específicas frente a la proteína de la cápside del PCV2 (Trible *et al.*, 2011), pero no se relacionan con una reducción notoria de la viremia, pues son incapaces de neutralizarla completamente, motivo por el cual la viremia suele ser de larga duración (McIntosh *et al.*, 2006b; Seo *et al.*, 2012).

La producción de anticuerpos neutralizantes comienza a partir de los 10 días post-infección y en algunos casos no se detectan hasta pasados 28 días (Pogranichnyy *et al.*, 2000). En cerdos que presentan una respuesta inmune deteriorada la producción de anticuerpos neutralizantes se retrasa, como consecuencia el PCV2 se replica más activamente y estos cerdos terminan por desarrollar la PCV2-SD (Meerts *et al.*, 2006; Fort *et al.*, 2007). Por tanto, el estado inmunitario del animal condiciona la producción de anticuerpos neutralizantes, y por tanto la viremia de PCV2: cuanto mayor es su cantidad, mayor es la protección frente a la infección por PCV2 (Fort *et al.*, 2007).

En el caso de la vacunación, algunas vacunas son capaces de inducir una seroconversión, pero todas inducen la producción de anticuerpos neutralizantes (Opriessnig *et al.*, 2008a, 2009b; Martelli *et al.*, 2011). Cuando los cerdos que se han vacunado se infectan con PCV2, esos anticuerpos limitan la diseminación sistémica y la replicación del virus. Esta es la razón por la que la infección en cerdos vacunados es asintomática, con viremias más reducidas y de menor duración.

En los fetos la respuesta inmune humoral sólo sucede si la infección ocurre después del día 75 de gestación, cuando ya son inmunocompetentes (Sánchez *et al.*, 2001).

1.4.4.3 Respuesta inmune celular a la infección por PCV2

La respuesta inmune celular a la infección por PCV2 es el elemento clave para superar esta infección pues los anticuerpos, exceptuando los neutralizantes, no son totalmente protectores.

La respuesta inmune celular frente a PCV2 se dirige a la cápside del virus y a la proteína que codifica la replicación del virus (Fort *et al.*, 2010). Esta respuesta se basa en la producción de interferón gamma (IFN-γ) específico frente a PCV2 por parte los linfocitos T, el cual regula la diferenciación de los linfocitos inmaduros y la activación de los macrófagos (Steiner *et al.*, 2009).

USC DE COMPOSTELA

A partir de los 14 días post-infección se empiezan a detectar las células secretoras de IFN-γ, alcanzando su pico a los 21 días post-infección, y descendiendo gradualmente conforme se reduce la viremia (Fort *et al.*, 2009a). En los casos en que la linfopenia por

la infección por PCV2 limita una secreción adecuada de IFN-γ, la respuesta inmune celular es incapaz de controlar la replicación de PCV2. Esto, unido a la tardanza en generar anticuerpos neutralizantes, hace que en esos casos la infección por PCV2 muy probablemente acabe provocando un cuadro de PCV2-SD (Kekarainen *et al.*, 2010).

La vacunación frente a PCV2 provoca un aumento en la población de células secretoras de IFN-γ e induce la producción de IFN-γ específico frente a PCV2 (Fort *et al.*, 2009b; Seo *et al.*, 2012; Koinig *et al.*, 2015). Este es uno de los motivos que protege a los cerdos vacunados de la infección por PCV2.

1.4.4.4 Patogenia del Síndrome de Dermatitis y Nefropatía Porcina

El PDNS se considera que se origina por una reacción de hipersensibilidad de tipo 3 al depósito de inmunocomplejos antígeno-anticuerpo de PCV2 (Chae, 2005; Gillespie *et al.*, 2009). Una viremia elevada y prolongada en el tiempo, junto a una producción elevada de anticuerpos frente a PCV2 conllevan una formación vertiginosa de inmunocomplejos. Esta concentración elevada de inmunocomplejos antígeno-anticuerpo acaba provocando un daño en la pared vascular y en los capilares glomerulares, con los consiguientes fallos circulatorio y renal (Opriessnig *et al.*, 2007).

1.5 Signos clínicos y lesiones asociadas a la infección por PCV2

1.5.1 Enfermedades asociadas a la infección por PCV2

La infección por PCV2 puede pasar desapercibida a la inspección visual o provocar distintos cuadros clínicos dependiendo de la edad de los cerdos infectados. Los principales cuadros clínicos asociados a la infección por PCV2 se indican en la Tabla 5. Tradicionalmente también se diferenciaban la Enfermedad entérica por PCV2 y la Enfermedad pulmonar asociada a PCV2. Estas dos formas presentan una baja incidencia y actualmente se consideran como parte de la PCV2-SD ya que que sus signos clínicos y lesiones coinciden con los observados en esta última enfermedad (Ticó *et al.*, 2013).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 5. Enfermedades asociadas a la infección por PCV2: principales signos clínicos y lesiones. Modificado de Segalés (2012).

Enfermedad	Principales signos clínicos	Lesiones macroscópicas	Lesiones microscópicas
Infección subclínica por PCV2 (PCV2-SI)	• Disminución de la ganancia de peso diaria (GMD)	• No apreciable	• Ninguna o muy ligera depleción linfoide con inflamación granulomatosa en los tejidos linfoides.
Enfermedad Sistémica por PCV2 (PCV2-SD)	• Disminución de la GMD • Desmedro y pérdida de peso progresiva • Disnea y dificultad respiratoria • Diarrea • Palidez generalizada	• Aumento tamaño ganglios linfáticos • Pelo largo y áspero • Ausencia de colapso pulmonar • Atrofia y decoloración hepática • Enteritis catarral • Petequias o infartos en riñones	• Modera a severa depleción linfoide con inflamación granulomatosa en tejidos linfoides. • Neumonía intersticial, fibroplastia bronquiolar, bronquiolitis • Nefritis intersticial • Hepatitis y/o fibrosis perilobular
Enfermedad reproductiva por PCV2 (PCV2-RD)	• Abortos o partos con momias • Retorno regular a estro	• Fetos momificados o edematosos • Hepatomegalia y congestión hepática fetal • Hipertrofia cardíaca fetal con áreas del miocardio descoloridas • Ascitis, hidrotórax e hidropericardio en fetos	• Fibrosis supurativa a necrotizante o miocarditis en fetos • Congestión hepática en fetos • Neumonía moderada en fetos
Síndrome de Dermatitis y Nefropatía porcina (PDNS)	• Pápulas y máculas en la piel, distribuidas por la región inguinal y área perineal	• Edema subcutáneo en áreas afectadas • Incremento tamaño ganglios linfáticos, sobretodo inguinal superficial • Cicatrices en la piel de animales que se curan • Nefromegalia, con petequias en corteza y edema en pelvis renal • Infartos esplénicos	• Vasculitis sistémica necrotizante • Glomerulitis fibrino-necrotizante • Nefritis intersticial con glomeruloesclerosis en animales que se recuperan de la fase aguda • Grado variable de depleción linfoide con inflamación granulomatosa en tejidos linfoides

La diseminación del PCV2 por todo el organismo de los cerdos y su capacidad para replicarse en gran variedad de epitelios y órganos conlleva que gran variedad de sistemas orgánicos estén afectados. En la Tabla 6 se indica de forma orientativa el grado de afectación de cada sistema del organismo en cada enfermedad asociada a la infección por PCV2.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 6. Grado de afectación de distintos sistemas orgánicos en cada enfermedad asociada a PCV2. Adaptado de Opriessnig y Langohr (2012).

Órgano o sistema afectado	Enfermedad			
	PCV2-SI	PCV2-SD	PCV2-RD	PDNS
Sistema linfoide		+++	+	+
Sistema respiratorio		+++		
Sistema digestivo		++		
Sistema urinario		+		+++
Sistema cardiovascular		+	+++*	+
Sistema nervioso		+		
Sistema reproductivo		+		
Sistema integumentario		+		+++
Sistema endocrino		+		

Las cruces indican el grado de afectación, siendo +++ una afectación grave y + una afectación leve
* En fetos

1.5.2 Infección subclínica por PCV2 (PCV2-SI)

Actualmente es la presentación más habitual (Segalés, 2012). De todas las enfermedades asociadas a PCV2 es la que conlleva un mayor coste económico a nivel de granja (Alarcon *et al.*, 2013).

Cuando la PCV2-SI no coexiste con infecciones secundarias el único signo clínico es una ligera disminución del crecimiento diario de los cerdos, imperceptible a simple vista. En los casos en que la PCV2-SI coexiste con alguna infección secundaria se favorecen los signos clínicos de esta infección concomitante (Opriessnig *et al.*, 2007).

Además, a causa de la alteración del sistema inmune, también se ha descrito que esta infección disminuye de la eficacia de algunas vacunas (Opriessnig *et al.*, 2006b).

Macroscópicamente no se observan lesiones. A nivel microscópico se puede observar una ligera depleción linfoide e inflamación granulomatosa en uno o dos ganglios linfáticos; además, también se puede observar una leve neumonía intersticial.

1.5.3 Enfermedad Sistémica por PCV2 (PCV2-SD)

Inicialmente denominada como Síndrome Multisistémico de Desmedro Postdestete (PMWS por sus siglas en inglés). Como se ha comentado en el apartado Epidemiología, se considera una enfermedad multifactorial en la que el PCV2 es el agente esencial (Segalés, 2012). De todas las enfermedades en las que está involucrado el PCV2 ésta es la más estudiada, tanto por su frecuencia de aparición antes de la disponibilidad de vacunas como por las pérdidas que ha ocasionado.

En sus primeras descripciones, se mencionaba una morbilidad de entre un 4 y un 30 % de los cerdos, pudiendo llegar al 60 % en las granjas más afectadas; la tasa de mortalidad oscila entre el 4 y el 20 % (Segalés y Domingo, 2002). No obstante, en la situación actual de vacunación generalizada, la PCV2-SD no se suele observar salvo casos puntuales (Segalés, 2015).

Ningún signo clínico de la PCV2-SD es patognomónico. El principal signo clínico es un adelgazamiento progresivo o "desmedro", que suele ir acompañado de apatía, disnea, palidez de piel, diarrea y en algunos casos también ictericia (Figura 14) (Harding y Clark, 1997). Esta variedad de signos clínicos depende del grado de afectación de los órganos en que se puede replicar el PCV2.



Figura 14. Cerdo afectado por PCV2-SD comparado con un cerdo sano.

Los signos clínicos de la PCV2-SD se pueden observar en cerdos desde 1 mes de vida hasta la edad de sacrificio, aunque lo más habitual es observarlos en cerdos de entre 7 y 15 semanas de edad (Madec *et al.*, 2000). En los primeros días post-infección se observa apatía y fiebre de hasta 41 ºC (Gillespie *et al.*, 2009). Una vez que la viremia se ha instaurado, el cuadro clínico avanza rápidamente. Se puede observar a simple vista un incremento del tamaño de los ganglios linfáticos inguinales, especialmente del inguinal superficial. Además, a consecuencia del adelgazamiento progresivo es frecuente observar claramente la espina dorsal del cerdo (Harding and Clark, 1997; Segalés *et al.*, 2004b). La disnea, la taquipnea y la palidez de piel también son muy frecuentes; en cambio, los cuadros diarreicos no son tan habituales (Madec *et al.*, 2000).

Además, debido a la inmunosupresión que causa el PCV2, en el caso de coinfecciones que provoquen signos clínicos, el cuadro clínico de estas últimas se encuentra agravado.

Los órganos que se ven más afectados son los ganglios linfáticos y los pulmones, aunque también se pueden observar lesiones en órganos del sistema digestivo, urinario e incluso a nivel sistémico (Segalés y Domingo, 2002).

Sistema linfoide

La principal alteración macroscópica en el sistema linfoide se observa en los ganglios linfáticos. Se trata de un incremento del tamaño, perceptible a simple vista en los ganglios inguinales y en los mesentéricos, aunque en otros como los mediastínicos y los bronquiales también suele observar esta linfadenopatía (Harding

y Clark, 1997). Al corte, su superficie está ligeramente húmeda y presenta un color marrón pálido homogéneo por toda su superficie (Segalés *et al.*, 2005a). En los casos avanzados de PCV2-SD, los ganglios se pueden observar sin alteraciones o incluso atrofiados; además, en estas situaciones habitualmente también se observa esta atrofia en el timo (Segalés *et al.*, 2004b).

A nivel microscópico las lesiones más características se observan en los órganos linfoides (ganglios linfáticos, bazo, placas de peyer y tonsilas): una depleción linfoide, acompañada de la pérdida de la estructura folicular, y una inflamación granulomatosa (Figura 15), ésta última a consecuencia de la infiltración y del reemplazo de los folículos por histiocitos (Harding y Clark, 1997; Sorden, 2000; Segalés *et al.*, 2004b). Esta depleción linfoide es evidente a partir del día 14 post-infección y se comienza a resolver en torno al día 35 post-infección (Opriessnig *et al.*, 2004b). Además, también es habitual observar células gigantes multinucleadas en todos los tejidos linfoides y cuerpos de inclusión en los macrófagos presentes en estos órganos (Segalés y Domingo, 2002); asimismo, en torno a un 10 % de cerdos con PCV2-SD también muestran una linfadenitis necrotizante, con necrosis en el centro de los folículos más prominentes (Segalés *et al.*, 2004b; Opriessnig y Langohr, 2012).

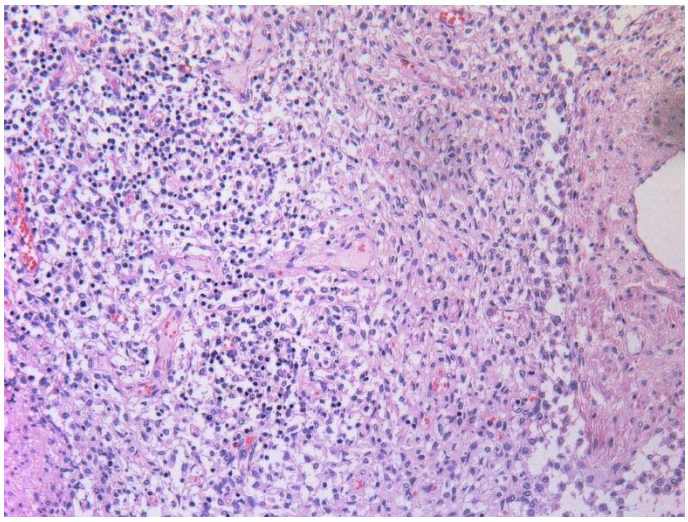


Figura 15. Depleción linfoide e inflamación granulomatosa en un ganglio linfático de un cerdo con PCV2-SD.

Sistema respiratorio

Lo más llamativo a nivel macroscópico es la ausencia de colapso pulmonar al acceder a la cavidad torácica, pulmones con consistencia gomosa, a veces con un moteado color canela y generalmente con una neumonía intersticial muy marcada (Figura 16). Además, es habitual observar bronconeumonías con consolidación cráneo-ventral asociada a infecciones secundarias (Segalés y Domingo, 2002).

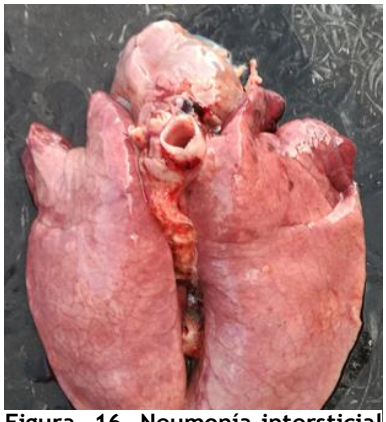


Figura 16. Neumonía intersticial por PCV2. Nótese la consolidación cráneo-ventral.

Microscópicamente, estas lesiones se corresponden con una bronquiolitis y una hiperplasia fibrosa peribronquiolar, que acaba generando una fibrosis y edema en los septos alveolares en los casos más

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

avanzados (Segalés *et al.*, 2004b). Asimismo, se puede observar un infiltrado granulomatoso junto con cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos a nivel bronquial, bronquiolar y alveolar (Opriessnig y Langohr, 2012).

Por otro lado, también se han descrito casos de neumonía proliferativa y necrotizante, en la que la neumonía intersticial se caracterizaba por la presencia de abundante sustancia hialina en la luz alveolar junto con el depósito de fibrina en los bronquiolos (Opriessnig y Langohr, 2012).

Sistema digestivo

Las lesiones en el sistema digestivo se limitan al hígado, estómago e intestino. Macroscópicamente la lesión más frecuente es una ulceración en la *pars* esofágica del estómago (Segalés y Domingo, 2002), la cual probablemente es la responsable de la anemia sufren y la palidez que muestran los cerdos con PCV2-SD (Harding, 2004). En general el hígado se encuentra sin alteraciones macroscópicas apreciables salvo en algunos casos un punteado de color amarillo en la superficie; en casos avanzados sí está afectado volviéndose flácido y más pequeño (Allan y Ellis, 2000; Quintana *et al.*, 2001). A nivel intestinal, macroscópicamente se pueden ver secciones acuosas y un adelgazamiento en la pared del íleon y ocasionalmente edema en el ciego (Harding y Clark, 1997).

A nivel microscópico la lesión más característica es una enteritis granulomatosa caracterizada por un incremento de macrófagos y células gigantes multinucleadas en la mucosa y la submucosa del íleon (Opriessnig y Langohr, 2012). En los hepatocitos se ha descrito un infiltrado de histiocitos; a medida que avanza la infección se pueden apreciar vacuolas en el citoplasma de algunos hepatocitos junto a una desorganización de los lobulillos hepáticos. En los casos más avanzados se produce una necrosis en los hepatocitos y como consecuencia se observa el cuadro de ictericia (Allan y Ellis, 2000; Segalés *et al.*, 2004b).

Se ha recomendado revisar siempre las lesiones microscópicas en el sistema digestivo ya que, aunque casi siempre aparecen conjuntamente con otras lesiones de PCV2-SD, es posible que sean la única alteración que provoca la infección por PCV2, limitándose los signos clínicos a un cuadro digestivo (Opriessnig y Langohr, 2012).

Sistema urinario

A nivel renal, macroscópicamente en algunos casos se puede apreciar un punteado blanco distribuido por toda la corteza del riñón junto a una apariencia edematosa; no obstante, es una lesión menos frecuente que las mencionadas hasta ahora (Harding y Clark, 1997; Quintana *et al.*, 2001).

Microscópicamente estas lesiones se localizan en la región córtico-medular del parénquima renal, pudiendo extenderse hacia la corteza o la médula. Se trata de una

nefritis intersticial granulomatosa; no se observan daños en los glomérulos pero sí cambios degenerativos en el epitelio tubular y restos celulares en su luz (Sarli *et al.*, 2008). Se ha indicado que las lesiones renales indican un cuadro crónico de la infección por PCV2, no observándose hasta los 35 días post-infección (Opriessnig y Langohr, 2012).

Otros sistemas orgánicos

También se pueden encontrar lesiones en otros órganos aunque son mucho menos frecuentes. A nivel del sistema nervioso central se han descrito edemas y hemorragias, distribuidas de forma aleatoria por las meninges y el parénquima, predominando en la sustancia gris. Microscópicamente se asocian con una vasculitis necrotizante e infiltrados de macrófagos, junto con degeneración neuronal (Corrêa *et al.*, 2007; Seeliger *et al.*, 2007). En órganos endocrinos como el páncreas, la tiroides y las glándulas adrenales no se observan lesiones macroscópicas, aunque microscópicamente se puede ver una infiltración de histiocitos y una ligera atrofia en los acini pancreáticos (Harding y Clark, 1997; Opriessnig y Langohr, 2012).

1.5.4 Enfermedad Reproductiva por PCV2 (PCV2-RD)

Desde las primeras descripciones, la infección por PCV2 se ha ligado a una alteración a nivel reproductivo en las granjas (West *et al.*, 1999). Sin embargo, en condiciones de campo, la presentación de esta enfermedad es poco habitual (Pensaert *et al.*, 2004). El hecho de que una gran proporción de cerdas reproductoras se infectasen en su etapa de crecimiento tiene un efecto protector para la manifestación de PCV2-RD en edad adulta. Por ese motivo tradicionalmente era poco frecuente observar casos de PCV2-RD en cerdas reproductoras (Segalés, 2012). Cuando se observa, suele restringirse a situaciones de una alta incidencia de PCV2 o a primoinfecciones en cerdas reproductoras. Sin embargo, esta última situación se ha vuelto más frecuente en la actualidad ya que la vacunación en los lechones no protege hasta la edad adulta, de manera que las cerdas reproductoras que no hayan sido revacunadas adecuadamente pueden adquirir la infección durante la etapa reproductiva y desarrollar la PCV2-RD (Figueras *et al.*, 2016; Oropeza-Moe *et al.*, 2017; Eddicks *et al.*, 2018).

Los signos clínicos dependerán del momento en que se produzca la infección en la cerda gestante, su viremia y la respuesta inmune del animal (Tabla 7). Así, puede haber desde repeticiones acíclicas como consecuencia de la reabsorción embrionaria, a partos prematuros, aumento de lechones momificados, de nacidos muertos e incremento del índice de mortalidad durante la fase de lactación (Harding, 2004; Chae, 2005; Opriessnig *et al.*, 2007). En el caso de las cerdas los signos clínicos son

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

inaparentes, habiéndose descrito únicamente pirexia y anorexia en las cerdas que abortan (Park *et al.*, 2005).

Tabla 7. Signos clínicos observados según el momento de infección en las cerdas gestantes. Adaptado de Madson y Opriessnig, (2011).

Etapa de gestación		
Temprana (1 – 35 días)	**Media (35 – 70 días)**	**Tardía (70 – 115 días)**
• Muerte embrionaria • Retorno irregular al estro • Pseudogestación • Camadas reducidas	• Abortos • Fetos momificados	• Fetos momificados • Nacidos muertos • Abortos • Partos tardíos • Lechones nacidos débiles • Camadas normales

Las lesiones sólo se observan en los fetos que se infectan antes de ser inmunocompetentes (Pensaert *et al.*, 2004). Así, se suelen localizar en camadas con nacidos momificados, muertos o nacidos débiles (Madson y Opriessnig, 2011). Macroscópicamente se observa congestión y una hipertrofia cardíaca, la cual puede provocar una hepatomegalia y ascitis y/o un edema pulmonar. Las alteraciones más llamativas se observan en el corazón, el cual presenta un moteado pálido por todo el miocardio y dilatación de ambos ventrículos (Brunborg *et al.*, 2007; Madson *et al.*, 2009a). Menos frecuentemente se puede observar un incremento del tamaño de los ganglios linfáticos, edema en el colon y petequias en el bazo.

A nivel microscópico las lesiones más características se localizan en el miocardio. Los cardiomiocitos están degenerados, necróticos o se han reemplazado por tejido conectivo fibroso y áreas de mineralización. Se observa una miocarditis con infiltración de linfocitos, macrófagos y células gigantes multinucleadas (West *et al.*, 1999; Johnson *et al.*, 2002; Brunborg *et al.*, 2007). Las lesiones microscópicas en el pulmón, hígado y los ganglios linfáticos, si están presentes, son muy similares a las descritas en los cerdos en crecimiento (Opriessnig y Langohr, 2012).

1.5.5 Síndrome de Dermatitis y Nefropatía porcina (PDNS)

El PDNS se asoció por primera vez con el PCV2 en el año 2000 (Rosell *et al.*, 2000). La mayor parte de los casos se observan en cerdos durante la fase de cebo, aunque también se pueden observar casos puntuales en lechones de fase de transición e incluso en cerdos adultos (Chae, 2005; Gillespie *et al.*, 2009). Este síndrome se caracteriza por presentar una prevalencia inferior al 1% aunque con unas tasas de mortalidad muy elevadas: prácticamente del 100 % en cerdos de cebo, en pocos días tras la aparición de los primeros signos; y en torno al 50 % en lechones de menos de 3 meses, los cuales de recuperarse vuelven a ganar peso (Segalés *et al.*, 1998).

Es la única manifestación clínica asociada a la infección por PCV2 que no se ha logrado reproducir experimentalmente (Opriessnig y Halbur, 2012).

Los animales afectados están letárgicos, febriles (40 a 41 ºC), presentan anorexia, diarrea acuosa o heces negras y orina sanguinolenta. Lo más destacable es la aparición de máculas en la piel en las regiones posteriores y distales del cuerpo de los cerdos. En los cuadros terminales se observa incoordinación motora y temblores (Segalés *et al.*, 1998; Drolet *et al.*, 1999; Harding, 2004).

Los órganos más afectados son la piel y los riñones, y en menor medida los órganos linfoides. Las lesiones macroscópicas en la piel aparecen de forma aguda y se corresponden con máculas y pápulas, que oscilan de color rojo a morado y al aumentar de tamaño pueden llegar a confluir. Estas lesiones aparecen en las extremidades posteriores, área inguinal, orejas y en algunos casos también partes distales de las extremidades anteriores (Figura 17). En los animales que sobreviven a la enfermedad, las lesiones acaban desapareciendo al cabo de pocas semanas (Segalés *et al.*, 1998; Drolet *et al.*, 1999; Harding, 2004).

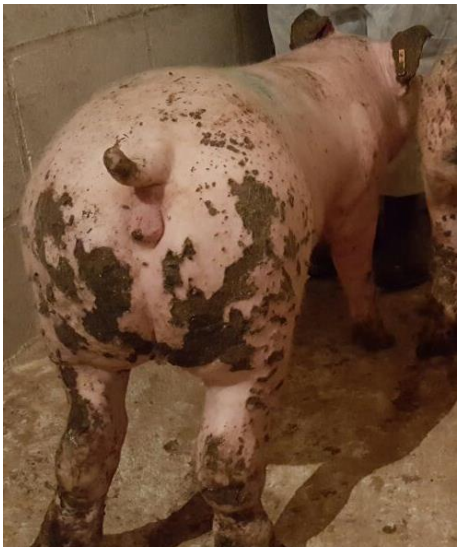


Figura 17. Cerdo afectado por el PDNS.

A nivel renal se observa una nefromegalia, los riñones presenta una consistencia firme y color pálido, observando también petequias distribuidas por la corteza y edema en la pelvis renal. Los ganglios linfáticos, especialmente los renales, están aumentados de tamaño y presentan un color rojo oscuro (Segalés *et al.*, 1998).

A nivel microscópico, las lesiones de la piel se corresponden con una vasculitis necrotizante de los capilares de la dermis y la hipodermis, acompañada de trombosis e infartos en los tejidos circundantes (Johnstone y Lawton, 2008). En los riñones, microscópicamente las lesiones se corresponden con una glomerulonefritis fibrinosa o necrotizante y una nefritis intersticial (Segalés *et al.*, 1998). En los ganglios linfáticos microscópicamente hay una depleción linfoide junto con un infiltrado granulomatoso.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.6 Diagnóstico de las infecciones por PCV2

1.6.1 Muestras utilizadas en el diagnóstico de la infección por PCV2

1.6.1.1 Órganos y tejidos

Constituyen las muestras que proporcionan más información para el diagnóstico de las enfermedades asociadas al PCV2. En concreto, las muestras de tejidos linfoides (ganglios linfáticos, bazo, placas de Peyer, tonsilas) son las más recomendadas y las únicas que permiten diagnosticar las enfermedades asociadas a PCV2. Esto se debe a que en estos tejidos se observan las lesiones más características de esta infección: depleción linfoide e inflamación granulomatosa (Segalés y Domingo, 2002). Otros órganos útiles para el diagnóstico son los pulmones, los riñones, el hígado y el intestino (Opriessnig *et al.*, 2007). En el caso de los fetos, lechones nacidos muertos o lechones recién nacidos el órgano de elección es el corazón (Pensaert *et al.*, 2004). El uso de estas muestras se limita a animales que han fallecido o a los que se realiza la eutanasia.

1.6.1.2 Sangre / suero

Su versatilidad para analizarlas de forma individual o en *pools,* unida a la posibilidad de detectar la infección y monitorizar su respuesta inmune, la convierten en la muestra más utilizada en condiciones de campo (Segalés, 2012). Así, este tipo de muestras se utiliza cuando se trabaja con grupos de cerdos (Grau-Roma *et al.*, 2009). No obstante, la sangre o el suero por sí solas no permiten diagnosticar las formas clínicas asociadas a la infección por PCV2, siendo necesarias muestras de tejidos para diagnosticar estos procesos clínicos (Segalés, 2012).

1.6.1.3 Fluidos orales

Los fluidos orales son otra muestra que, al igual que la sangre/suero, sólo es válida para diagnosticar la PCV2-SI; por sí sola no es suficiente para diagnosticar las demás enfermedades asociadas. Sin embargo, a partir de los fluidos orales se puede monitorizar tanto la infección por PCV2 como los anticuerpos (IgG) que generan los animales (Prickett *et al.*, 2008, 2011; Oliver-Ferrando *et al.*, 2016).

Estas muestras ofrecen una mayor sensibilidad a nivel de granja para detectar la infección por PCV2 que las muestras de suero ya que no proceden de un solo individuo, sino de un colectivo de cerdos. Además, guardan una buena correlación con la viremia y los niveles de IgG en los animales (Oliver-Ferrando *et al.*, 2016; Nielsen *et al.*, 2018).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

1.6.1.4 Ambientales

Las muestras del ambiente en el que están los cerdos (superficies y aire) se han utilizado para detectar el PCV2 con resultados prometedores (Verreault *et al.*, 2010; Dvorak *et al.*, 2013; Anderson *et al.*, 2020), pero su uso todavía no se ha generalizado como el de los fluidos orales. Exceptuando la PCV2-SI, no son suficientes para diagnosticar enfermedades asociadas a PCV2.

1.6.1.5 Hisopos nasales, rectales, heces y leche/calostro

Son muestras en las que se puede detectar la presencia de PCV2 (McIntosh *et al.*, 2008; Patterson *et al.*, 2011b). No obstante, no son suficientes para diagnosticar enfermedades asociadas y no se utilizan en la toma de muestras rutinaria para esta infección.

1.6.2 Técnicas de diagnóstico disponibles

Las principales técnicas de diagnóstico que se utilizan en el diagnóstico de la infección por PCV2 se indican en la Tabla 8.

Tabla 8. Principales técnicas directas e indirectas utilizadas en el diagnóstico de PCV2.

Técnicas directas: detectan la presencia de PCV2	Técnicas indirectas: detectan la respuesta inmunitaria a la infección por PCV2
• Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	• Inmunoadsorción ligada a enzimas (ELISA)
• Inmunohistoquímica (IHC)	• Neutralización viral
• Hibridación *in situ* (ISH)	• Inmunoperoxidasa en monocapa (IPMA)
• Aislamiento vírico	• Inmunoadsorción ligada a enzimas de puntos (ELISPOT)

1.6.2.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Técnica altamente específica y sensible que permite detectar ADN de PCV2 en prácticamente cualquier tipo de muestra. Requiere de un paso previo en el que se extrae el ADN presente en las muestras. La PCR se basa en la replicación enzimática termo-dirigida de una secuencia de ADN específica del PCV2 (normalmente una secuencia de genes de la ORF-2) (Larochelle *et al.*, 2000; Olvera *et al.*, 2004; Opriessnig *et al.*, 2006b; Brunborg *et al.*, 2007). La replicación se hace de forma cíclica, donde los productos resultantes de la primera replicación sirven de molde para el siguiente ciclo de replicación. Así se obtiene una amplificación exponencial de la secuencia ADN deseado (Wittwer y Makrigiorgos, 2012).

Una variante de la PCR es la PCR en tiempo real o cuantitativa (qPCR). La qPCR permite monitorizar la amplificación, obteniendo información a lo largo de todo el proceso. Esta variante utiliza sondas fluorescentes que se unen a un lugar específico en la secuencia diana. Así, a medida que se amplifica la secuencia de ADN se libera la

sonda y se emite una señal de fluorescencia, que es captada por el termociclador (Wittwer y Makrigiorgos, 2012). Además, esta variante permite utilizar un control interno, el cual es otra secuencia de ADN distinta a la del ADN deseado. Este control interno también se detecta mediante otra señal de fluorescencia y se utiliza para garantizar que la qPCR se ha realizado correctamente.

Los ciclos necesarios para que la señal de fluorescencia alcance un valor umbral se denominan ciclo umbral (Ct). El Ct guarda una relación inversa con la cantidad inicial de ADN deseado: a menor Ct, mayor cantidad de ADN. Por tanto, es una medida que permite realizar comparaciones entre distintas muestras e incluso obtener una cuantificación de la cantidad aproximada de ADN presente en la muestra. Para esto último, a partir de cantidades conocidas del ADN problema, es posible obtener una recta de cuantificación (Figura 18). A continuación, interpolando el Ct obtenido en cada muestra en dicha recta se obtiene la cantidad de copias.

Dada la alta sensibilidad de la qPCR, y la ubicuidad de la infección por PCV2, la sola detección de ADN de PCV2 en muestras de los cerdos nunca es suficiente para confirmar casos de enfermedad debida a PCV2 (Segalés *et al.*, 2005a). No obstante, la cuantificación sí resulta interesante como diagnóstico predictivo, puesto que una mayor cantidad de PCV2 se correlaciona con lesiones más graves y, probablemente, con enfermedades por PCV2 (Brunborg *et al.*, 2004; Olvera *et al.*, 2004). Además su uso es interesante para garantizar la ausencia del virus en determinadas muestras, como por ejemplo en el comercio de semen porcino (Larochelle *et al.*, 2000).

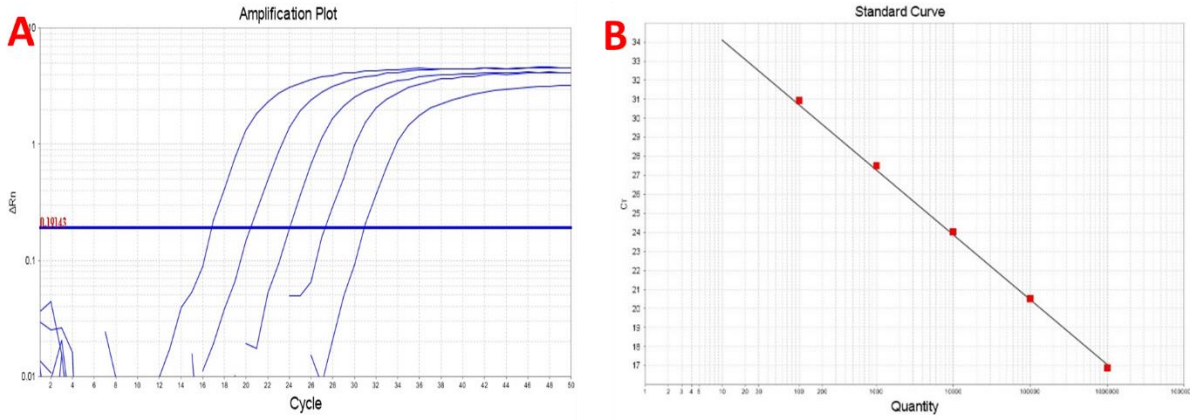


Figura 18. Resultados de una qPCR tras una amplificación con cantidad seriada de ADN. A. El Eje X representa el ciclo de la PCR, el eje Y la fluorescencia emitida y la línea horizontal representa el umbral de detección. Las líneas que alcanzan antes el umbral tienen de una cantidad mayor de ADN problema. B. Recta de cuantificación obtenida a partir de las muestras de la figura A. El eje Y se corresponde con el Ct y el eje X con la cantidad de ADN.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.6.2.2 Inmunohistoquímica (IHC)

Se usa un anticuerpo monoclonal o policlonal para detectar la presencia de antígenos de PCV2 en tejidos fijados en formol o en preparaciones de parafina (Sorden

et al., 1999). La cantidad de antígeno viral que se observa en las preparaciones tras la realización de esta técnica muestra una buena correlación con la cantidad de PCV2 detectada mediante qPCR (Brunborg *et al.*, 2004).

1.6.2.3 Hibridación *in situ* (ISH)

Permite detectar ADN de PCV2 en preparaciones de tejidos (Rosell *et al.*, 1999). Actualmente su uso se ha sustituido la PCR.

1.6.2.4 Aislamiento vírico

Se realiza mediante la inoculación de fluidos corporales a cultivos celulares de células renales de cerdo para que el PCV2 se replique y se pueda detectar (Pogranichnyy *et al.*, 2000). Su uso se limita a la investigación debido a lo laborioso de la técnica y su menor sensibilidad respecto a la PCR.

1.6.2.5 Inmunoadsorción ligada a enzimas (ELISA)

Técnica en la que se detectan anticuerpos frente a PCV2. Mediante esta técnica se pueden detectar tanto las IgG como las IgM (habitualmente frente a la cápside del PCV2) y se pueden utilizar muestras de suero, leche/calostro y fluidos orales (Carasova *et al.*, 2007; Dvorak *et al.*, 2013; Oliver-Ferrando *et al.*, 2016). A pesar de su versatilidad con distintos tipos de muestras, no son útiles para diagnosticar enfermedades por PCV2, ya que la mayoría de los cerdos seropositivos están sanos. Así, su uso se restringe a estudios epidemiológicos en las granjas, a la monitorización de los programas vacunales y a la vigilancia del nivel de anticuerpos maternales para evitar su interferencia con las vacunas (Feng *et al.*, 2016; Oliver-Ferrando *et al.*, 2016; Dvorak *et al.*, 2018).

1.6.2.6 Neutralización viral

Técnica que se basa en la detección de anticuerpos neutralizantes frente a PCV2. Sólo se realiza en muestras de suero. Al igual que el ELISA no es suficiente para diagnosticar enfermedades por PCV2 y no se usa de forma rutinaria. Su uso se localiza principalmente en estudios de eficacia de vacunas y en planes vacunales (Fort *et al.*, 2009b; Opriessnig *et al.*, 2010; Seo *et al.*, 2012).

1.6.2.7 Inmunoperoxidasa en monocapa (IPMA)

Técnica que permite detectar anticuerpos frente a PCV2 a partir de muestras de suero (Segalés y Domingo, 2002). A causa de lo laborioso de esta técnica, su uso se ha sustituido por los ELISA y actualmente se limita al campo de la investigación.

1.6.2.8 Inmunoadsorción ligada a enzimas de puntos (ELISPOT)

Es una variante del ELISA que se utiliza para medir la inmunidad celular frente a PCV2. Se determina el número de células secretoras de IFN-γ en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs). Sólo se realiza en muestras de suero y no es suficiente para diagnosticar enfermedades por PCV2. No se utiliza de forma rutinaria a nivel de campo y su uso se limita a la investigación y en estudios de eficacia vacunal (Martelli *et al.*, 2011; Seo *et al.*, 2014b).

1.6.3 Criterios para el diagnóstico de las enfermedades asociadas a PCV2

Para el diagnóstico de las enfermedades asociadas a PCV2, en primer lugar se debe diferenciar entre infecciones subclínicas y clínicas y a su vez entre las diferentes formas clínicas asociadas a la infección. Para este propósito existen una serie de criterios y recomendaciones que se enumeran a continuación.

1.6.3.1 Infección subclínica por PCV2 (PCV2-SI)

Los criterios para diagnosticar la PCV2-SI son los siguientes:

1. Ausencia de signos clínicos compatibles con la infección.
2. Ausencia de lesiones o lesiones microscópicas leves en los tejidos linfoides.
3. Demostración de la infección activa por PCV2.

1.6.3.2 Enfermedad sistémica por PCV2 (PCV2-SD)

Para el diagnóstico individual de la PCV2-SD se han de cumplir los siguientes criterios (Sorden, 2000; Segalés y Domingo, 2002):

1. Presencia de signos clínicos compatibles: adelgazamiento progresivo, disnea y dificultad respiratoria, diarrea, palidez generalizada.
2. Presencia de lesiones histológicas características en tejidos linfoides: depleción linfoide e inflamación granulomatosa.
3. Detección de una cantidad moderada – elevada de PCV2 en esas lesiones; $>10^6$ copias de PCV2/ml suero (Brunborg *et al.*, 2004; Grau-Roma *et al.*, 2009), o detección de una cantidad elevada de PCV2 en más de un órgano linfoide, en al menos uno linfoide y uno sistémico o en más de un órgano sistémico (Opriessnig *et al.*, 2007).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

La presencia de PCV2-SD puede limitarse a unos pocos individuos de la granja sin que esto suponga un problema relevante a nivel de granja (Grau-Roma *et al.*, 2011). Esto implica que para considerar que una granja presenta un problema clínico de PCV2-SD no basta con el diagnóstico individual de PCV2-SD en un número reducido

de animales. De esta manera, para a nivel de grupo, es necesario seguir unos criterios adicionales (Grau-Roma *et al.*, 2011):

1. Incremento significativo de la mortalidad, comparada con los datos históricos de la granja, asociada a la observación de signos clínicos compatibles con la enfermedad.
2. Diagnóstico individual de PCV2-SD en al menos 1 de cada 3 – 5 cerdos con sintomatología compatible, coincidente con ese incremento de mortalidad.

1.6.3.3 Enfermedad reproductiva por PCV2 (PCV2-RD)

El diagnóstico de PCV2-RD se realizará cuando se presenten alteraciones reproductivas: abortos y/o nacidos muertos o bajas tasas de fecundidad (Segalés, 2012); y se cumplan una serie de criterios. En el caso de que se presenten abortos o nacidos muertos los criterios serían los siguientes:

1. Fallo reproductivo coincidente con la fase final de la gestación.
2. Miocarditis fibrinosa o necrotizante en los fetos o nacidos muertos.
3. Cantidad moderada a elevada de PCV2 ($>10^6$ copias/g tejido) en el corazón de los fetos o nacidos muertos.

En el caso de cerdas gestantes que retornan al celo, los criterios necesarios para diagnosticar la PCV2-RD serían los siguientes:

1. Repeticiones de celo acíclicas.
2. Viremia de PCV2 o seroconversión coincidentes con el retorno a celo.

1.6.3.4 Síndrome de Dermatitis y Nefropatía porcina (PDNS)

Para diagnosticar casos de PDNS se requieren los siguientes criterios:

1. Presencia de lesiones macroscópicas compatibles.
2. Vasculitis sistémica necrotizante y glomerulonefritis fibrinosa.
3. Cantidad reducida de PCV2 en los tejidos linfoides o $<10^6$ copias PCV2/ml suero (Segalés, 2012).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.7 Prevención y control de la infección por PCV2

1.7.1 Tratamiento

No existe un tratamiento eficaz frente a la infección por PCV2. Así, las acciones terapéuticas se centran en paliar los signos clínicos. En los primeros años de la década de 2000 se ensayó la seroterapia para combatir la PCV2-SD (Waddilove y Marco, 2002). Ésta consistía en inyectar subcutáneamente el suero de cerdos que habían superado la infección a los lechones que presentaban los primeros signos de enfermedad. Aunque esta medida pudo conseguir cierta reducción del índice de mortalidad, los resultados también fueron inconsistentes (Madec *et al.*, 2008).

1.7.2 Medidas de prevención distintas a la vacunación

La infección por PCV2 necesita de cofactores para provocar un cuadro clínico de enfermedad (Segalés *et al.*, 2013). Por tanto, el control de las enfermedades asociadas debe tener en cuenta la influencia de un buen número de factores de diferentes orígenes: manejo, genética, estado inmunitario… De esta manera es importante disponer de protocolos integrados para el manejo del rebaño que minimicen las consecuencias de la infección por PCV2.

1.7.2.1 Los 20 puntos de Madec

El plan de los 20 puntos de Madec (Madec *et al.*, 2000) constituye una serie de medidas de manejo que pretenden disminuir la exposición de cerdos susceptibles al PCV2, reduciendo así la incidencia de la infección y la transmisión del virus. Aunque estos puntos se describieron pensando en el control de PCV2, realmente se pueden aplicar al control de cualquier enfermedad infecciosa. En la Tabla 9 se indican los 20 puntos de Madec.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 9. Plan de los 20 puntos de Madec. Adaptado de Segalés, (2007).

Salas de partos
1. Realizar un manejo todo dentro-todo fuera con limpieza y desinfección de las instalaciones, incluyendo las fosas de purín entre lotes.
2. Lavado y desparasitación de las cerdas antes del parto.
3. Realizar adopciones sólo si es necesario y siempre en las 24 horas post-parto.
Salas de transición
4. Corrales pequeños y con divisiones sólidas.
5. Realizar un manejo todo dentro-todo fuera con limpieza y desinfección de las instalaciones, incluyendo las fosas de purín entre lotes.
6. Densidad máxima de 3 lechones/m^2.
7. Espacio en el comedero superior a 7 cm/cerdo.
8. Mantener una buena calidad de aire (NH_3 <10 ppm; $C0_2$ <0,1 %; humedad relativa < 85 %).
9. Mejorar el control de temperatura.
10. No mezclar lotes de lechones.
Salas de engorde y finalización
11. Corrales pequeños y con separación sólida.
12. Realizar un manejo todo dentro-todo fuera con limpieza y desinfección de las instalaciones, incluyendo las fosas de purín entre lotes.
13. No mezclar cerdos de cebo con cerdos procedentes de transición.
14. No mezclar cerdos de cebo de distintos corrales.
15. Superficie de al menos 0,75 m^2/cerdo.
16. Mejorar la calidad del aire y la temperatura.
Puntos adicionales
17. Programa vacunal adecuado a cada granja.
18. Flujo adecuado de cerdos y de aire entre los edificios de la granja.
19. Higiene estricta en cualquier manipulación de cerdos (descolmillado, vacunaciones…).
20. Rápida separación de los enfermos a las cuadras de lazareto, o eutanasia de los mismos de ser necesario.

Entre esas medidas destaca la importancia del manejo en todo dentro-todo fuera y la limpieza y desinfección (L+D) de las instalaciones, siendo una medida común en todas las fases productivas y también en lo que atañe a los elementos utilizados para la manipulación de los cerdos. Las demás medidas se encaminan a una mejora del manejo, a una reducción la densidad y contacto entre animales. Así, reduciendo la manipulación de los cerdos, acompañado de una buena higiene cuando sea necesario, y minimizando el contacto entre cerdos se limita la transmisión del PCV2 y la presión de infección (Madec *et al.*, 2000).

1.7.2.2 Genética de los cerdos

Como se ha mencionado previamente, algunas razas de cerdos son más propensas a desarrollar enfermedades asociadas a PCV2 que otras. Así, una posible medida para controlar la infección por PCV2 es utilizar razas menos susceptibles (López-Soria *et al.*, 2004; Opriessnig *et al.*, 2006a).

1.7.2.3 Control de las coinfecciones

Junto con el manejo y la L+D, son las medidas de mayor peso en el control de la infección por PCV2 sin recurrir a las vacunas. Dentro de estas coinfecciones, el virus del PRRS, el parvovirus porcino y *M. hyopneumoniae* son los patógenos clave ya que predisponen al desarrollo de PCV2-SD (Opriessnig y Halbur, 2012).

Por tanto, un programa vacunal adecuado y eficaz frente a esos tres patógenos, conllevaría de forma secundaria un mejor control del PCV2 y de sus enfermedades asociadas. De forma similar, minimizar la presión de infección de otros patógenos como *G. parasuis*, *L. intracellularis* o el virus Influenza evitaría que estos microorganismos agravaran el cuadro clínico tras la infección por PCV2. Un caso extremo de estas situaciones sucede en aquellas granjas que por su situación sanitaria están libres de la infección por el virus del PRRS, de *M. hyopneumoniae* y de los serotipos 2, 6 y 12 de *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Nielsen *et al.*, 2017). En estas granjas, la vacunación frente a PCV2 no proporciona una mejora de la ganancia media de peso diaria, del peso final, del índice de conversión ni de la proporción de cerdos que necesitan algún tratamiento antibiótico (Nielsen *et al.*, 2017).

1.7.2.4 Modulación del sistema inmune

Como se ha comentado previamente, la vacunación frente a algunos patógenos puede tener un efecto sinérgico en la replicación del PCV2 y, por consiguiente, incrementar la gravedad de la infección (Opriessnig *et al.*, 2003). De esta forma, excluir algunas pautas vacunales sería eficaz para reducir la incidencia de PCV2. No obstante, desde un punto de vista general, esta nunca se recomienda ya que, aunque limitase la problemática del PCV2, incrementaría la casuística de las otras infecciones.

No obstante, sabiendo a qué edad se produce de forma aproximada la infección por PCV2 en la granja, se podrían revisar y reajustar los programas vacunales para limitar su interacción con el virus (Chae, 2012b). Por ejemplo, se ha comprobado adelantar la vacunación frente a *M. hyopneumoniae* a la primera semana de vida de los lechones mejora los parámetros productivos y reduce las lesiones asociadas a PCV2 tras el desafío con el virus, respecto a si esta vacunación se realizaba en la tercera semana de vida (Kim *et al.*, 2011).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.7.2.5 Otras medidas

Algunos estudios han observado una reducción de los signos clínicos de la infección por PCV2 tras la adición de Vitamina E, Selenio, plasma o ácido linoleico a la dieta de los lechones (Bassaganya-Riera *et al.*, 2003; Baekbo *et al.*, 2004; Dewey *et al.*, 2006). No obstante, estos estudios han perdido interés cuando se comenzaron a comercializar las vacunas frente a esta infección.

Otra medida que ha resultado eficaz fue realizar un destete precoz a los 10 – 12 días de vida (Opriessnig *et al.*, 2004a). No obstante, la eficacia de esta medida también radica en que a continuación en que los cerdos se trasladaron a unas dependencias totalmente controladas, previa L+D y con unas medidas de bioseguridad muy elevadas. De hecho, esto último es lo equivalente a un vacío sanitario y posterior repoblación de cerdos, intentando garantizar que no se introducen lechones infectados. El vacío sanitario y la repoblación también es una medida que se ha demostrado eficaz (Patterson *et al.*, 2011d); no obstante, puesto que esta medida conlleva el cierre total de la granja durante un tiempo no se suele tener en cuenta salvo en situaciones muy puntuales.

1.7.3 Vacunación frente a PCV2

La vacunación es la principal herramienta para controlar la infección por PCV2. Las vacunas se desarrollaron para controlar la PCV2-SD, pero actualmente se utilizan para prevenir todas las enfermedades asociadas a PCV2 (Chae, 2012a). La vacunación frente a PCV2 proporciona casi siempre un retorno económico, motivo por el que actualmente casi todos los cerdos se vacunan, constituyendo estas vacunas el producto preventivo más utilizado en el sector porcino (Segalés, 2015).

1.7.3.1 Tipos de vacunas disponibles

Actualmente en España se comercializan cinco vacunas frente a PCV2 (Tabla 10). Todas ellas son inactivadas y se basan en la expresión de la proteína de la cápside (ORF2) del genotipo PCV2a, presentando inmunidad cruzada frente a los demás genotipos (Beach y Meng, 2012; Opriessnig *et al.*, 2014b; Jeong *et al.*, 2015; Park *et al.*, 2019).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 10. Vacunas comerciales frente a PCV2 disponibles actualmente en España.

Nombre comercial	Compañía farmacéutica	Sustancia activa	Adyuvantes	Especies de destino	Pauta vacunal indicada por el fabricante
Circovac®	Ceva	PCV2a inactivado	Parafina líquida	Cerdas nulíparas	Una dosis intramuscular de 2 ml seguida por otra dosis 3 - 4 semanas después, 2 semanas antes de la cubrición. Aplicar otra dosis 2 semanas antes del parto
				Cerdas adultas	Una dosis intramuscular de 2 ml seguida por otra dosis 3 - 4 semanas después, 2 semanas antes del parto. Revacunar en cada gestación entre 2 y 4 semanas antes del parto
				Lechones a partir de 3 semanas de vida	Una dosis intramuscular de 0,5 ml
Ingelvac® CircoFLEX	Boehringer Ingelheim	Proteína ORF2 (cápside) de PCV2a	Carbómero (polímero hidrofílico)	Lechones a partir de 2 semanas de vida	Una dosis intramuscular de 1 ml
Porcilis® PCV/ Porcilis® PCV ID	Intervet (MSD)	Proteína ORF2 (cápside) de PCV2a	Parafina líquida Acetato de dl-α-tocoferilo	Lechones a partir de 3 semanas de vida	Una dosis intramuscular de 2 ml; una dosis intradérmica de 0,2 ml en el caso de Porcilis® PCV ID
Suvaxyn® Circo	Zoetis	PCV1 inactivado expresando la ORF2 (cápside) de PCV2[a]	Escualano Polisorbato Poloxamer (polímero hidrofóbico)	Lechones a partir de 3 semanas de vida	Una dosis intramuscular de 2 ml
Mhyosphere® PCV ID	Hipra	*M. hyopneumoniae* expresando la ORF2 de PCV2	Aceite mineral	Lechones a partir de 3 semanas de vida	Una dosis intradérmica de 0,2 ml

Circovac® fue la primera vacuna disponible (se introdujo en el año 2006) y se basa en un PCV2a inactivado. Inicialmente su uso se registró para cerdas nulíparas y reproductoras, aunque posteriormente también se aprobó para lechones (Fraile *et al.*, 2012a).

Ingelvac® CircoFLEX y Porcilis® PCV son vacunas de subunidades. Se basan en la expresión de la proteína de la cápside del PCV2 en un baculovirus y, después de la inactivación y purificación, se obtienen partículas víricas morfológicamente indistinguibles de las del PCV2 (Fort *et al.*, 2008; Kixmöller *et al.*, 2008). Actualmente

su uso está registrado para lechones a partir de 3 semanas de vida, aunque de forma excepcional también se utilizan en cerdas nulíparas y/o reproductoras (Opriessnig *et al.*, 2010; Fraile *et al.*, 2015; Martelli *et al.*, 2016).

Suvaxyn® Circo es una vacuna recombinante. Utiliza un virus quimera inactivado entre PCV1 y PCV2; se utiliza como base el PCV1 pero se reemplaza su ORF2 por la del PCV2 (Fenaux *et al.*, 2004b). Su uso también está únicamente registrado para lechones a partir de 3 semanas de vida, aunque excepcionalmente también se utiliza en cerdas reproductoras (Hemann *et al.*, 2014).

Recientemente ha comenzado a comercializarse Mhyosphere® PCV ID. Esta vacuna utiliza una cepa recombinante e inactivada de *M. hyopneumoniae*, la cual expresa la proteína de la cápside del PCV2 en su citoplasma. Su uso solamente está registrado para lechones a partir de 3 semanas de vida.

De las vacunas mencionadas, Mhyosphere® PCV ID es la única bivalente, puesto que también incluye a *M. hyopneumoniae*. No obstante, todas las demás también disponen de una presentación conjunta con esta bacteria, ya sea de forma combinada (Porcilis® PCV M Hyo; Suvaxyn® Circo + MH RTU (Witvliet *et al.*, 2015)) o permitiendo mezclar las vacunas de PCV2 y de *M. hyopneumoniae* en el momento previo a su administración (Ingelvac® CircoFLEX + Ingelvac® MycoFLEX; Circovac® + Hyogen® (Kaalberg *et al.*, 2017; Sibila *et al.*, 2020)).

1.7.3.2 Defensa inmune tras la vacunación

La defensa inmune tras la vacunación frente a PCV2 se basa en la activación de las respuestas inmunes humoral y celular (Kekarainen *et al.*, 2010; Chae, 2012a).

Exceptuando la vacuna Mhyosphere® PCV ID ya que hasta la fecha la información disponible es muy limitada, todas las vacunas comerciales inducen una producción eficiente de anticuerpos neutralizantes tras su administración (Figura 19) (Seo *et al.*, 2014b; Segalés, 2015). La producción de los anticuerpos neutralizantes sigue una dinámica similar a la que se observa en infecciones con el virus, esto es, comienza a partir de los 10 – 15 días post-vacunación. En varios estudios comparativos entre esas cuatro vacunas, se ha observado que Suvaxyn® Circo y Circovac® tienden a provocar una mayor producción de anticuerpos neutralizantes que las vacunas de subunidades. No obstante, en todas las vacunas utilizadas se observó que la cantidad de anticuerpos neutralizantes se correlacionaba inversamente con la viremia de PCV2 (Park *et al.*, 2014; Seo *et al.*, 2014c, 2014d).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

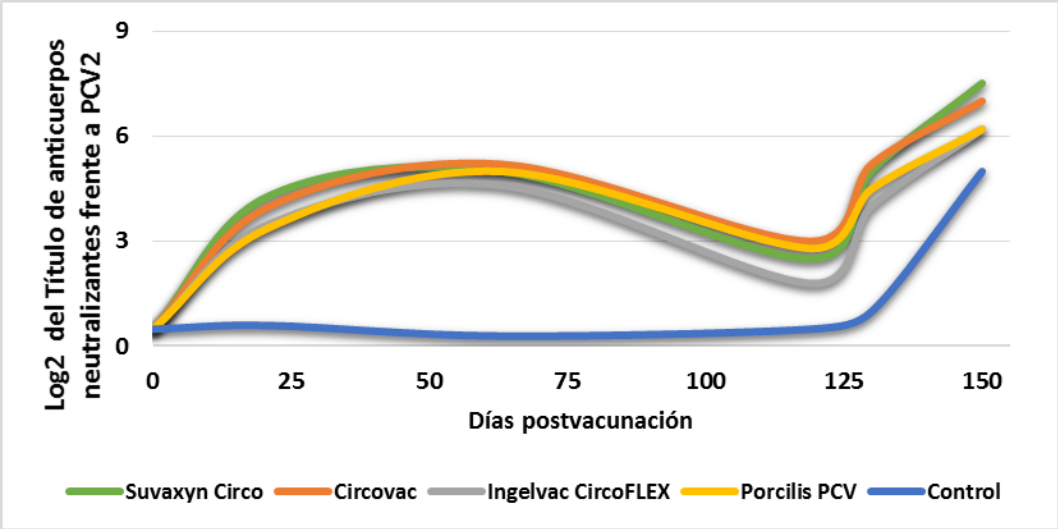


Figura 19. Respuesta de anticuerpos neutralizantes de cada vacuna tras su administración y posterior desafío con PCV2. Adaptado de Park *et al.*, (2014).

En cambio, la respuesta serológica medida como IgG es diferente según la vacuna administrada. Así, las vacunas inactivadas y recombinantes pueden producir desde una seroconversión tras su administración hasta mantener estable el nivel de IgG presentes en el momento de la vacunación (Opriessnig *et al.*, 2009c; Fraile *et al.*, 2012b; Seo *et al.*, 2014b). En cambio, las dos vacunas de subunidades muestran un patrón distinto: por un lado, Porcilis® PCV provoca una seroconversión tras su administración, mientras que Ingelvac® CircoFlex no provoca esta respuesta (Martelli *et al.*, 2011; Koinig *et al.*, 2015); no obstante, en este último caso, sí se observa la seroconversión si posteriormente el cerdo vacunado tiene contacto con el PCV2 (Koinig *et al.*, 2015). Esta diferencia entre vacunas se puede deber a la distinta naturaleza que tiene cada una respecto al PCV2 y también por los adyuvantes que utilizan (Chae, 2012a; Segalés, 2015).

La respuesta de IgG que provoca cada vacuna es un punto importante para interpretar correctamente los resultados de algunas técnicas de diagnóstico como los ELISA. Así, según la vacuna utilizada, la observación de seroconversión puede ser un efecto inherente a la vacuna o bien indicar la existencia de una circulación de PCV2. Por tanto, de granjas que vacunan frente a PCV2 se debe de tener en cuenta el producto utilizado para una correcta interpretación de los resultados laboratoriales.

Respecto a la inmunidad celular, también se ha comprobado que tras la vacunación se induce la producción y el mantenimiento de poblaciones de linfocitos T secretores de IFN-γ (Ferrari *et al.*, 2014; Seo *et al.*, 2014b; Segalés, 2015). No obstante, todavía no existe información disponible sobre la vacuna Mhyosphere® PCV ID debido a su reciente desarrollo. Al igual que sucede tras la infección por PCV2, las células secretoras de IFN-γ se detectan a partir de las 2 – 3 semanas post-vacunación,

independientemente de la vacuna comercial utilizada (Figura 20) (Fort *et al.*, 2009b; Martelli *et al.*, 2011; Jeong *et al.*, 2015; Koinig *et al.*, 2015). Concretamente, en estudios comparativos se ha descrito que la vacuna Suvaxyn® Circo tiende a inducir una mayor producción de células secretoras de IFN-γ tras la vacunación que la vacuna Circovac® y ésta, que las vacunas de subunidades. Asimismo, al igual que sucedía con los anticuerpos neutralizantes, en todos los casos la cantidad de células secretoras de IFN-γ estaba inversamente relacionada con la viremia de PCV2 (Park *et al.*, 2014; Seo *et al.*, 2014b, 2014c).

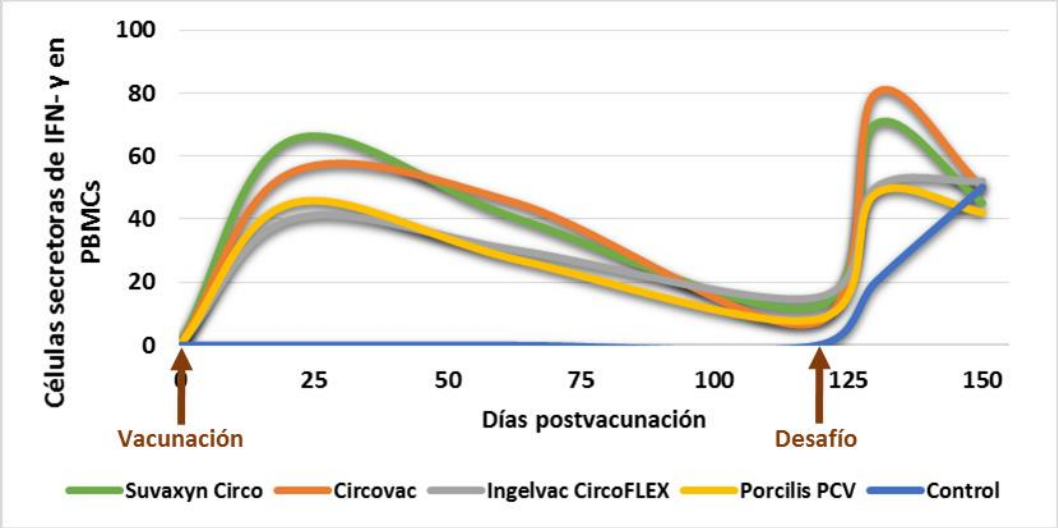


Figura 20. Respuesta de la producción de células secretoras de IFN-γ de cada vacuna tras su administración y posterior desafío con PCV2. Adaptado de Park *et al.*, (2014).

1.7.3.3 Protocolos vacunales frente a PCV2

1.7.3.3.1 Cerdas reproductoras y nulíparas

La vacunación de las cerdas reproductoras y nulíparas puede tener tres objetivos: prevenir la infección por PCV2 en su descendencia, proteger a las cerdas frente a la PCV2-RD, y mantener una inmunidad similar en todo el colectivo. Según el objetivo que se pretenda, el momento de vacunación puede ser diferente (Figura 21).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

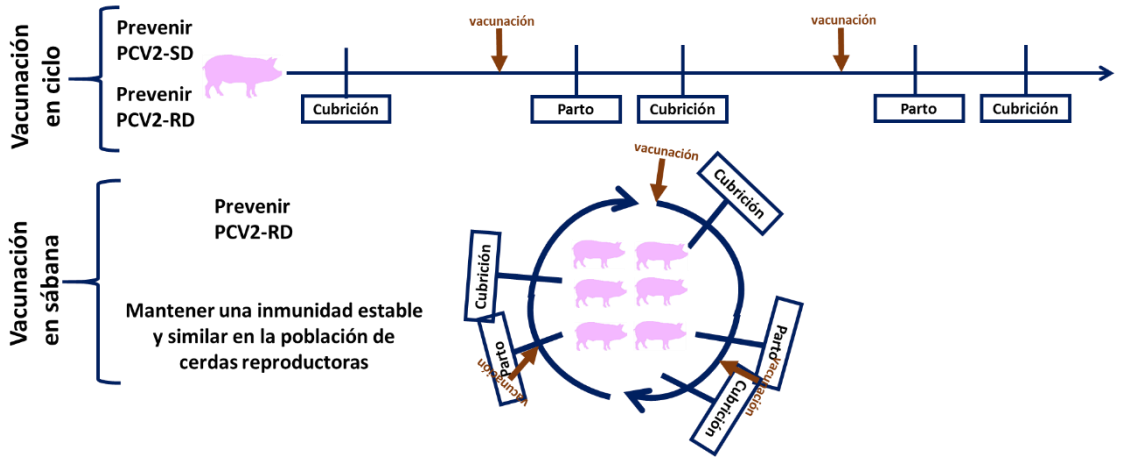


Figura 21. Posibles planteamientos y pautas vacunales frente a PCV2 para las cerdas reproductoras.

En el primero de los objetivos, el fundamento de vacunar a las cerdas reproductoras entre 15 y 20 días antes del parto (siempre después de una primovacunación previa) se basa en proporcionar inmunidad pasiva a los lechones a través del calostro (Segalés, 2015); por lo tanto, siempre tiene que ir acompañada de un correcto encalostramiento de los lechones (Soraci, 2018). Así, esta pauta vacunal es la recomendada en casos de infecciones tempranas por PCV2 ya que protege a los lechones hasta una edad más avanzada.

Se ha demostrado que los lechones procedentes de cerdas vacunadas tienen un mayor nivel de anticuerpos y de IFN-γ frente a PCV2 que los procedentes de cerdas no vacunadas (Opriessnig *et al.*, 2010; Kurmann *et al.*, 2011; Fraile *et al.*, 2012b; Oh *et al.*, 2012; Oliver-Ferrando *et al.*, 2018b). Además, esta pauta vacunal es eficaz para reducir la prevalencia de la infección por PCV2, prevenir el desarrollo de PCV2-SD y mejorar la GMD de los lechones de esas cerdas (Opriessnig *et al.*, 2010; Pejsak *et al.*, 2010; Kurmann *et al.*, 2011). En cambio, no impide totalmente la excreción de PCV2 a través de las secreciones lácteas, aunque sí reduce su cantidad (Gerber *et al.*, 2011).

La situación de vacunar a las cerdas para prevenir la PCV2-RD es menos habitual ya que también lo es esta presentación de enfermedad (Chae, 2005). En estos casos lo ideal sería vacunar a las cerdas antes de la cubrición (Segalés, 2015); no obstante, se ha visto que con la pauta vacunal antes descrita o mediante una vacunación en sábana también se consigue evitar la PCV2-RD (Pejsak *et al.*, 2012). Así, se ha visto que la vacunación antes del parto también consigue evitar desde alteraciones reproductivas hasta proporcionar una mejora en los índices reproductivos (Kurmann *et al.*, 2011; Pejsak *et al.*, 2012; Hemann *et al.*, 2014; Oliver-Ferrando *et al.*, 2018a).

El tercer objetivo de vacunar a las cerdas reproductoras, mantener un nivel estable de inmunidad frente a PCV2, pretende evitar la existencia de subpoblaciones susceptibles y puntualmente padecer fallos reproductivos o infecciones tempranas

(Martelli *et al.*, 2015; Figueras *et al.*, 2016; Oliver-Ferrando *et al.*, 2018a). Aunque la pauta descrita previamente suele ser suficiente para este fin, la vacunación en sábana facilita el manejo y disminuye el riesgo de posibles interferencias con la vacunación en lechones en caso de altos niveles de anticuerpos maternales (Segalés, 2015).

En el caso de las cerdas nulíparas, actualmente lo más habitual es que reciban una primera dosis cuando son lechones y después sean revacunadas durante la fase de aclimatación en la granja de producción (Segalés, 2015). Posteriormente, se decide una revacunación previa al parto o en sábana según la situación particular de cada granja.

1.7.3.3.2 Lechones

La vacunación de lechones frente a PCV2 es la medida preventiva más extendida en la producción porcina. Esta medida se basa en la estimulación activa de su sistema inmune y sus efectos se observan de forma casi instantánea, mientras que para lograr un efecto similar sólo con la vacunación de las cerdas reproductoras se precisa de al menos un año de vacunación continuada (Segalés, 2015).

La vacunación de los lechones está recomendada cuando la infección por PCV2 ocurre en cerdos a final de transición – inicio de cebo (Chae, 2012a). En general, las vacunas frente a PCV2 se administran a los lechones a partir de las 3 semanas de edad (Segalés, 2015). Se ha comprobado que la vacunación antes de las 8 semanas de vida es eficaz para prevenir infección por PCV2; a partir de esa edad los estudios muestran una pérdida de eficacia debido al poco tiempo entre la vacunación y el contacto con el virus (Cline *et al.*, 2008; Martelli *et al.*, 2016). Por el contrario, la vacunación frente a PCV2 antes de las 3 semanas de edad no resulta del todo eficaz debido a una interferencia con la inmunidad maternal.

Respecto a este último punto la información es contradictoria: mientras unos trabajos muestran que no existe interferencia con los anticuerpos maternales (Fachinger *et al.*, 2008; Opriessnig *et al.*, 2008b; Haake *et al.*, 2014), otros indican que ésta si puede existir (Fort et al., 2009b; Fraile et al., 2012a). En cualquier caso, es probable que la inmunidad celular también pudiera tener un papel en esa interferencia con la vacunación de los lechones (Oliver-Ferrando *et al.*, 2018b).

En casos muy puntuales puede ser necesario revacunar a los lechones (Horlen *et al.*, 2008; Opriessnig *et al.*, 2009c). En estas situaciones otra opción sería utilizar una vacuna intradérmica para evitar una posible interferencia con la inmunidad maternal, puesto que en la dermis no se produce la neutralización del antígeno vacunal.

USC DE COMPOSTELA

En cualquier caso, todas las vacunas que se administran en torno a las 3 – 4 semanas de vida proporcionan una protección eficaz contra la infección por PCV2, disminuyendo el porcentaje de cerdos infectados, la viremia y la duración de la misma.

Asociado a esto se aprecia una disminución de los signos clínicos y de las lesiones asociadas a PCV2, y también de aquellas infecciones que apareciesen de forma secundaria debido al cuadro clínico. Así, todas las vacunas llevan asociada una mejora significativa del crecimiento de los cerdos, especialmente durante la fase de cebo (Figura 22), acortando los tiempos productivos (da Silva *et al.*, 2014).

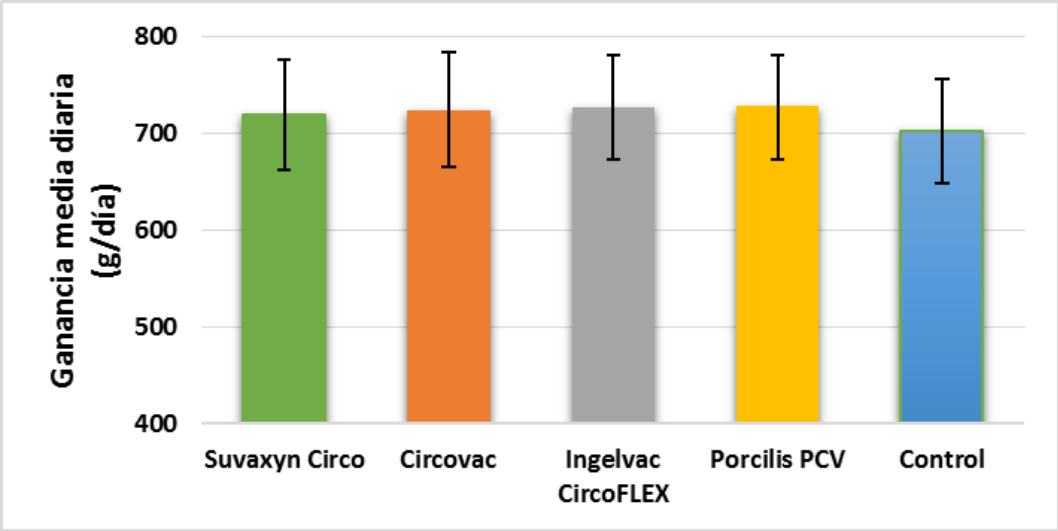


Figura 22. Ganancia media diaria de lechones vacunados frente a PCV2. Las barras representan la ganancia media diaria, en gramos, durante la fase de cebo; las líneas representan el intervalo del 95% de confianza. Resultados de un meta-análisis de da Silva *et al.*, (2014).

1.7.3.3.3 Cerdas y lechones

La vacunación conjunta de cerdas y lechones se está consolidando como una medida habitual durante el último lustro. Esto se debe a la disminución de la presión de infección por PCV2 tras una vacunación generalizada y, por consiguiente, el aumento de la proporción de cerdas nulíparas que llegan a la fase reproductiva sin tener apenas contacto previo con el virus (Eddicks *et al.*, 2018). Así, el objetivo de esta vacunación es doble: por un lado prevenir casos de PCV2-RD y por otro proporcionar una inmunidad suficiente a los lechones durante su fase de crecimiento.

En el caso de las cerdas reproductoras y nulíparas se realiza una vacunación en ciclo, 3 semanas antes del parto, o en sábana cada 4 o 6 meses. En el caso particular de las nulíparas, la vacunación se realiza también durante la cuarentena previa a su introducción en el ciclo productivo; posteriormente, sus lechones se vacunan a las 3 – 4 semanas de edad (Segalés, 2015). En estas situaciones se debe tener en cuenta que los lechones tendrán una mayor inmunidad maternal en el momento de su vacunación. Se sabe que los niveles elevados de anticuerpos en el momento de la vacunación limitan la seroconversión que provocan algunas vacunas y es más probable que lleguen a presentar una leve viremia durante la fase de cebo, lo cual puede afectar a su

crecimiento (Fort et al., 2009b; Fraile et al., 2012b; López-Soria et al., 2014; Feng et al., 2016).

Por tanto, en situaciones de esta pauta vacunal, los lechones se deben vacunar en una ventana de edad en la que se evite la interferencia con la inmunidad maternal y que les permita desarrollar una inmunidad suficiente para evitar la infección si tienen contacto con el virus (Chae, 2012a; Segalés, 2015). En estas situaciones es recomendable retrasar la vacunación de los lechones más allá de las 4 semanas de vida; de hecho, se ha comprobado que los mejores resultados se obtienen si la vacunación de los lechones se realiza a las 6 semanas de edad (Martelli *et al.*, 2016).

1.7.3.3.4 Verracos

La vacunación de verracos no está muy generalizada ya que en la actualidad se utiliza la inseminación artificial en prácticamente todas las granjas y se ha visto que en estas situaciones la transmisión a través del semen no es significativa (Segalés, 2015). En general, todas las vacunas provocan una reducción de la excreción de PCV2 a través del semen, pero es posible que alteren temporalmente la calidad seminal debido a reacciones como un incremento de la temperatura corporal tras la vacunación (Seo *et al.*, 2013; Caspari *et al.*, 2014).

1.8 Detección ambiental de patógenos en producción de porcino

Las muestras del ambiente engloban todo aquello que rodea a los animales y con lo que guardan un contacto más o menos permanente en su vida diaria. Es decir, se refieren a dónde viven, qué respiran, con qué tienen contacto…

La detección ambiental de patógenos en producción de porcino es una técnica que se comenzó a utilizar hace ya más de 30 años. Inicialmente su uso se centró en detectar bacterias, principalmente las que tienen potencial zoonótico como *Salmonella* spp., a partir depósitos de polvo o de muestras de aire (Elliott *et al.*, 1976; Thedell *et al.*, 1980; Donham *et al.*, 1986). Más recientemente, pero sobre todo a partir de 2010 debido al desarrollo y perfeccionamiento de las técnicas de biología molecular, las muestras del ambiente se comenzaron a utilizar para estudiar la epidemiología de enfermedades provocadas por virus (Otake *et al.*, 2002a; Anderson *et al.*, 2017). Actualmente, estos métodos se utilizan no sólo en investigación, sino ya a nivel campo con determinados objetivos: vigilancia de infecciones, evaluación de bioseguridad…

Entre las ventajas de la detección ambiental de patógenos se debe mencionar:

- es posible obtener información del estado sanitario de un gran número de animales con un número reducido de muestras, lo que disminuye los tiempos de muestreo y de coste laboratorial.
- en la mayoría de los casos no es necesario que el personal que realice esta toma de muestras tenga una formación específica.
- son técnicas de muestreo no invasivas; de hecho, en muchos casos no es necesario entrar a los corrales de los cerdos. De esta forma son métodos que garantizan totalmente el bienestar de los animales.

Entre las principales limitaciones actuales se deben indicar las siguientes:

- No existe un protocolo estandarizado para la toma de muestras.
- Otros factores como la ventilación de las granjas, o la presencia de sustancias inhibidoras pueden afectar a la toma de muestras y a su posterior análisis laboratorial.

1.8.1 Tipos de muestras ambientales

1.8.1.1 Superficies

Las muestras de superficies constituyen el tipo de muestra ambiental más habitual. Para la toma de muestras a partir de superficies no hay un protocolo estandarizado. En general se utilizan hisopos, esponjas, toallitas… (Pletinckx *et al.*, 2011; Patterson *et al.*, 2013; Garrido-Mantilla *et al.*, 2019) que se frotan por una parte de la superficie (la totalidad en ciertos casos) para que el elemento de muestreo "arrastre" los microorganismos presentes en la misma y se queden depositados en él. En el caso de superficies muy grandes como suelos de edificios o instalaciones habitualmente las muestras se toman dando un número determinado de pasos, generalmente 100, con calzas que recogen directamente la muestra o bien se puede pasar a continuación un hisopo por la calza, como si ésta fuese una superficie (Norma ISO 18593).

Al igual que no hay un protocolo establecido para el muestreo, tampoco lo hay para el material del que deben estar hechos los hisopos. Se han utilizado hisopos con cabezas de algodón, nylon, poliéster y microfibras y todos muestran resultados muy similares (Turnage y Gibson, 2017). Es más habitual utilizar hisopos humedecidos previamente, pero tampoco hay una recomendación de un determinado medio; esto se debe hacer *a posteriori* según las pruebas laboratoriales que se vayan a realizar con dichas muestras.

A partir de las muestras de superficies las pruebas laboratoriales más habituales son el cultivo, con enriquecimiento previo en casos concretos, e identificación

bacteriana o PCR para detectar ADN de un determinado microorganismo (Dee *et al.*, 2002; Friese *et al.*, 2012; Bangerter *et al.*, 2016; Neira *et al.*, 2016).

1.8.1.2 Aire

Para la toma de muestras de aire es indispensable utilizar un colector que "atrape" los microorganismos presentes en suspensión en el aire. Tampoco existe un protocolo generalizado ya que existen colectores que utilizan distintas tecnologías para captar los microorganismos. A continuación se describen los principales colectores que se utilizan en el muestreo del aire:

Impactadores sólidos: aceleran las partículas presentes en el aire a través de orificios cada vez más estrechos. La corriente se dirige hacia una superficie sólida y cambia bruscamente, haciendo que las partículas de aire choquen contra dicha superficie. Los microorganismos se pueden recuperar de la misma mediante un lavado o, esta superficie puede ser directamente una placa Petri (Figura 23). El colector más frecuente es el Andersen sampler o Andersen cascade impactor; se suele utilizar con flujos de aire de hasta 28,3 Litros/minuto (Kim *et al.*, 2008; Alonso *et al.*, 2015; Ferguson *et al.*, 2016).

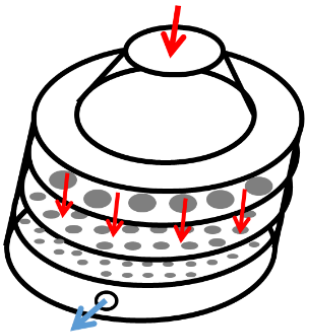


Figura 23. Esquema de un colector Andersen. Las flechas rojas indican la entrada de aire y la azul la salida. Adaptado de Verreault *et al.*, (2008).

Impactadores líquidos: conocidos como *impingers*. Consisten en un matraz con líquido en su parte inferior y una conducción de entrada de aire que se va estrechando progresivamente. Cuando se produce una caída de presión en el matraz, se aceleran las partículas presentes en el aire y se depositan en el líquido. Una variante son los colectores líquidos ciclónicos, que aceleran el aire usando un vórtice centrífugo, de forma que las partículas de aire se inyectan en el líquido (Figura 24). Algunos de los colectores más utilizados son el AGI-30 (impinger) o el Coriolis® µ (colector líquido ciclónico). Los volúmenes de aire que permiten utilizar estos colectores van desde 12,5 L/min en el caso de los *impingers* hasta volúmenes de hasta 400 L/min en el caso de los colectores líquidos ciclónicos (Dee *et al.*, 2009; Friese *et al.*, 2012; Corzo *et al.*, 2013a; Zhao *et al.*, 2014).

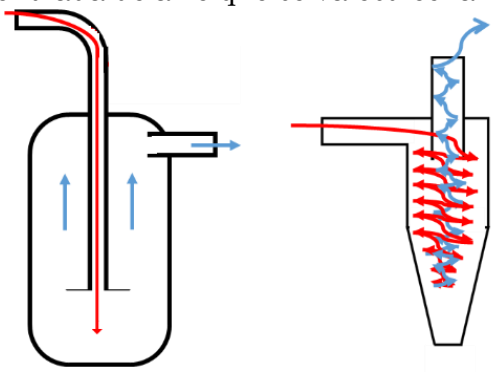


Figura 24. Esquema de un AGI (izqda.) y un colector líquido ciclónico (dcha). Las flechas rojas indican la entrada de aire y la azul la salida. Adaptado de Verreault *et al.*, (2008).

Filtros: a diferencia de los anteriores, en esta metodología las partículas presentes en el aire no se desvían de la línea de corriente. Consiste en un colector que hace pasar el aire a través de unos filtros en el que quedan depositadas las partículas presentes en el aire (Figura 25). Los filtros varían grosor, tamaño de poro y composición, pudiendo ser de celulosa, politetrafluoroetileno (PTFE), policarbonato o gelatina. A continuación, los filtros se pueden colocar en placas Petri o los microorganismos presentes en el mismo se pueden recuperar al disolverlo. Algunos de los colectores que utilizan esta tecnología son el MD8 Airport, el MD8 Airscan y el AirCheck Touch personal sampling pump. Los volúmenes de aire que permiten utilizar estos colectores oscilan desde 3,5 L/min hasta 125 L/min (Weesendorp *et al.*, 2008, 2009; Anderson *et al.*, 2020; López-Lorenzo *et al.*, 2020).

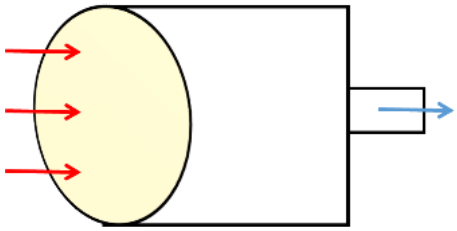


Figura 25 Esquema de colector de filtrado. Las flechas rojas indican la entrada de aire y la azul la salida. Adaptado de Verreault *et al.*, (2008).

Cada una de estas tecnologías de recolección de aire presenta ventajas e inconvenientes respecto a las otras. Por ejemplo, se ha comprobado que los colectores ciclónicos permiten obtener mayor sensibilidad de detección que los *impingers* y que los impactadores sólidos; no obstante, también se ha sugerido que los flujos de aire tan elevados que utilizan pueden dañar los microorganismos y dificultar el posterior crecimiento bacteriano o incluso la detección del virus. Los filtros parecen ser los que mejor correlacionan los microorganismos que "atrapan" con su cantidad en el ambiente, pero pueden desecar más la muestra y ser menos eficientes para algunas técnicas como cultivos víricos o bacterianos. En cuanto a los impactadores sólidos, presentan más dificultad para utilizarlos en condiciones de campo, pero permiten separar las partículas en función de su tamaño, lo cual puede ser muy útil para determinados objetivos (Friese *et al.*, 2012; Ahmed *et al.*, 2013; Adell *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2014; Alonso *et al.*, 2015; Stein *et al.*, 2018; Prost *et al.*, 2019).

A partir de las muestras de aire las pruebas laboratoriales más frecuentes son la detección del microorganismo mediante PCR, el cultivo e identificación bacteriana y en menor medida cultivo de virus (Anderson *et al.*, 2017).

1.8.2 Aplicaciones de las muestras ambientales en producción porcina

Las muestras ambientales en producción de cerdos se han utilizado con diversos fines: estudio de la epidemiología de las enfermedades, como herramienta de vigilancia de ciertas infecciones, para desarrollar y mejorar medidas de bioseguridad e incluso como herramienta para testar la eficacia de protocolos de limpieza y desinfección.

1.8.2.1 Estudio de la epidemiología de enfermedades

El análisis de las muestras del ambiente en que viven los cerdos ha permitido un mejor conocimiento de la persistencia de los patógenos en las granjas, su transmisión, especialmente en todo lo que atañe a la transmisión indirecta, y posibles mecanismos de infección y reinfección.

En un trabajo realizado en 1993 se comprobó que *Streptococcus suis* era capaz de permanecer viable más de 24 horas en superficies habituales de las granjas como cemento, plástico, madera y metal. Se concluyó que esta bacteria se podría transmitir a través del contacto con dichas superficies, especialmente cuando la L+D no es del todo eficaz (Dee y Corey, 1993). En otros trabajos se vio que *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli*, en conjunto, se detectaban en más del 35 % de las muestras de superficies como suelos, charcos, rodaduras de camiones…, incluso en sistemas con manejo TD-TF (Jensen *et al.*, 2006; Quintana-Hayashi y Thakur, 2012). De modo similar, Patterson *et al.*, (2013) tomaron muestras de mangos de las puertas, de comederos, bebederos, conductos de ventilación, suelos de corrales, fosas de purín… y estudiaron la presencia de *Brachyspira* spp. mediante cultivo. Sólo las muestras de los suelos y las fosas fueron positivas. En otro trabajo reciente se comprobó que el virus causante de la enfermedad de Aujeszky está ampliamente distribuido por el ambiente de granjas infectadas, incluyendo el parking, la entrada principal y el material de oficina (Li *et al.*, 2020). En estos trabajos se demuestra que estos patógenos son capaces de persistir en el ambiente de las granjas y, indicando además en qué superficies es más probable, con el consiguiente riesgo de infectar a nuevas bandas de cerdos.

Por otro lado, las muestras ambientales también han permitido comprender aspectos de la transmisión de microorganismos que hoy se consideran fundamentales. Esto se debe a numerosos trabajos realizados en la primera década de los 2000, los cuales demostraron como el virus del PRRS se puede transmitir de forma indirecta a través de las agujas, las manos de los cuidadores, las botas, los buzos de trabajo y los sacos de alimentos (Otake et al., 2002a, 2002b, 2002c; Pitkin et al., 2009a). Asimismo, esto también se ha observado con otros virus que infectan a los cerdos, como por ejemplo el de la peste porcina clásica (Ribbens *et al.*, 2007). A partir de estos trabajos se comenzó a dar importancia a medidas como el orden de trabajo en las granjas, atendiendo al nivel de exposición a los patógenos en cada dependencia.

Un aspecto de la transmisión en el que las muestras ambientales han permitido a una mejor comprensión es en lo referente a la transmisión aerógena. La detección y cuantificación de patógenos en muestras de aire ha permitido demostrar la transmisión aerógena en virus como el PRRS y ha aportado información epidemiológica sobre la capacidad de transmisión de distintas cepas de este virus (Pitkin *et al.*, 2009b; Stein *et al.*, 2018).

Asimismo, en otros estudios similares se ha demostrado que es posible detectar virus Influenza A, *M. hyopneumoniae*, virus del PRRS y virus de la DEP en muestras de aire tomadas a 2,1, 9,1, 9,2 y 16 km, respectivamente, de una granja con cerdos infectados (Dee *et al.*, 2009; Otake *et al.*, 2010; Corzo *et al.*, 2013a; Alonso *et al.*, 2014). A pesar de que la proporción de muestras de aire en que esto ocurre es muy reducida (menos del 5 %), al igual que la cantidad del patógeno, mediante un bioensayo se comprobó que el virus del PRRS y *M. hyopneumoniae* mantenían capacidad infectante.

Por otro lado, las muestras ambientales, y en especial las de aire, han permitido comprender aspectos de la epidemiología de algunas infecciones muy importantes desde el punto de vista de la salud pública, como es la Influenza A. Por ejemplo, se ha comprobado que la vacunación de cerdos con una cepa homóloga a la circulante proporciona mayor eficacia a la hora de reducir la excreción viral que las heterólogas; cuando ocurre un brote en una granja de cerdos, los niveles del virus en el aire se mantienen elevados durante al menos 20 días, con un pico entre el día 7 y el 11 post-infección; a partir de temperaturas de 25 ºC aunque el virus siga presente en el aire y en las superficies, rápidamente su capacidad infectante debido a la desecación (Corzo *et al.*, 2014; Neira *et al.*, 2016, 2018). Este conocimiento se puede utilizar para valorar el riesgo de transmisión entre cerdos y humanos en determinadas situaciones, minimizando la probabilidad de que suceda.

1.8.2.2 Herramienta para la vigilancia de infecciones

Esta aplicabilidad se ha utilizado para detectar y cuantificar la presencia de patógenos causantes de enfermedades, especialmente aquellos con capacidad zoonótica. Esto último es especialmente relevante ya que el uso de las muestras del ambiente es una forma de minimizar el contacto estrecho de las personas con los cerdos y, por consiguiente, el riesgo de infección.

Se ha visto que las muestras de aire y las de superficies son buenos predictores para detectar el virus de la Influenza A respecto a la muestra utilizada como referencia, los fluidos orales (Anderson *et al.*, 2016; Prost *et al.*, 2019). En concreto, Prost *et al.*, (2019) obtuvieron, respecto a los fluidos orales, una sensibilidad del 75,86 % y del 86,21 % para las muestras de superficies y de aire, siendo la especificidad del 77,78 % para ambos casos. De manera similar, también estudiando Influenza A, Neira *et al.*, (2016) observaron una correlación positiva significativa de 0,69 entre el recuento de positivos en fluidos orales y aire, y de 0,47 entre los fluidos orales y muestras de la superficie de los tabiques. Esto indica una relación directa entre el nivel de excreción por los cerdos y la exposición a través de aerosoles y determinadas superficies.

Corzo *et al.*, (2013b) comprobaron que, en condiciones experimentales, la posibilidad de detectar Influenza A en una muestra de aire se duplicaba por cada cerdo que se infectaba a mayores, llegando a la conclusión que la saturación del aire con

partículas víricas depende solamente de un mínimo de cerdos infectados (Corzo *et al.*, 2013b). Es decir, a partir de un determinado porcentaje de cerdos infectados siempre sería posible detectar el virus en muestras de aire.

Más recientemente se ha comparado el ratio de detección del virus Influenza A utilizando muestras de lechones individuales (hisopos nasales, orofaríngeos y toallitas nasales), muestras colectivas (fluidos orales, toallitas de la glándula mamaria de las cerdas lactantes y superficies como comederos, tabiques, bebederos) y muestras de aire, analizadas mediante qPCR (Garrido-Mantilla *et al.*, 2019). Los resultados que obtuvieron indican que las muestras de aire y de superficies muestran mejores ratios de detección que los hisopos nasales analizados en pools (Garrido-Mantilla *et al.*, 2019).

Esta forma de vigilancia también se ha extrapolado a otros patógenos que infectan a los cerdos, como *M. hyopneumoniae, A. pleuropneumoniae*, *S. aureus* resistentes a la meticilina, *S. suis*, PCV2, virus PRRS, Peste Porcina Clásica y *Leptospira* spp. (Weesendorp *et al.*, 2008; Dee *et al.*, 2010; Verreault *et al.*, 2010; Friese *et al.*, 2012; Bonifait *et al.*, 2014; Damte *et al.*, 2014; Watt *et al.*, 2020; Wójcik-Fatla *et al.*, 2020). Concretamente, *M. hyopneumoniae* y *A. pleuropneumoniae* se han detectado en muestras de aire de granjas con cerdos infectados (Damte *et al.*, 2014; Watt *et al.*, 2020). Habitualmente el abordaje de esos dos patógenos se realiza si se observan signos clínicos respiratorios y, sobre todo, si se observan lesiones significativas en el tejido pulmonar tras el sacrificio de los cerdos (Gottschalk y Broes, 2019). De esta forma, la detección precoz de estas infecciones bacterianas se podría utilizar para mejorar su control. Lo mismo sucede con los demás patógenos mencionados.

No obstante, la vigilancia de las infecciones no se refiere únicamente a la detección de determinados patógenos, sino que se incluyen las pruebas complementarias que se pueden realizar *a posteriori*. Por ejemplo, a partir muestras de aire tomadas en los alrededores de cuatro granjas de cerdos en áreas de alta densidad ganadera, Brito *et al.*, (2014) lograron secuenciar la mayor parte de las muestras con resultado positivo a virus PRRS. En las cuatro localizaciones detectaron cepas diferentes del virus, pero las de cada localización se agrupaban en un determinado clúster. Además, estos autores también detectaron en varias muestras de aire las cepas de virus PRRS que se utilizan en las vacunas vivas modificadas.

Otra aplicación de estas muestras es el estudiar de los perfiles de resistencia antimicrobiana, los genes de resistencia y los factores de virulencia que portan bacterias presentes en la granjas de cerdos como *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp. y *Streptococcus* spp. (Espinosa-Gongora *et al.*, 2012; Schmithausen *et al.*, 2015; Ruiz-Ripa *et al.*, 2020). Por ejemplo, ya en 2005 se había comprobado que más del 90 % de los géneros microbianos presentaban resistencia al menos a dos familias de antibióticos (Chapin *et al.*, 2005). Recientemente, a partir de muestras de aire, se ha

comprobado que ese perfil de resistencia se sigue observando en *Staphylococcus aureus* aislados en granjas de cerdos (mayores porcentajes de cepas resistentes en granjas intensivas que en semiextensivas), y se añade que portan una gran variedad de genes de resistencia (Ruiz-Ripa *et al.*, 2020).

1.8.2.3 Evaluación de las medidas de bioseguridad

Las muestras ambientales se han utilizado para evaluar la eficacia de protocolos de bioseguridad a la entrada a las granjas, riesgos inherentes al contacto con elementos externos y también la de determinados elementos constructivos para evitar la entrada de infecciones.

El protocolo de toma de muestras con hisopos se ha utilizado para evaluar la eficacia de protocolos de baja, media y alta bioseguridad para evitar la transmisión e infección de cerdos con los virus Influenza A y el de la DEP (Allerson *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2017). De esta forma, este tipo de muestras han proporcionado importante información para la bioseguridad como que el cambio de los buzos y de calzas, acompañado de un lavado de manos, no se puede considerar suficiente para prevenir la transmisión de estos patógenos (Allerson *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2017).

Asimismo, el protocolo de hisopado de superficies también se ha utilizado para tomar muestras de camiones que transportan cerdos de las granjas a los mataderos. En un trabajo realizado en el año 2004 se comprobó una estancia de 2 horas era suficiente para que cerdos infectados por el virus del PRRS contaminasen el camión; y que otras 2 horas eran suficientes para que cerdos susceptibles se infectasen (Dee *et al.*, 2004). A partir de ese trabajo se comenzó a considerar a los vehículos de transporte de cerdos como un riesgo para transmitir infecciones, y las medidas de bioseguridad se deben extremar durante las labores de carga. De hecho, en trabajos posteriores se comprobó que hasta el 6,6 y el 9 % de los vehículos estaban contaminados con ARN del virus de la DEP y con *Brachyspira hyodisenteriae*, respectivamente (Lowe *et al.*, 2014; Giacomini *et al.*, 2018).

Pero esto no aplica solamente a los camiones de transporte, ya que utilizando la toma de muestras de superficies se ha comprobado que esto también sucede en los vehículos particulares. Dee *et al.*, (2002) demostraron que el virus del PRRS se puede detectar en ambientes fríos en los elementos plásticos, metálicos y las ruedas de los vehículos al menos después de 4 horas post-exposición, incluso habiendo recorrido 50 kilómetros. Así, se han podido identificar riesgos potenciales para la entrada del virus del PRRS a las granjas como la acumulación de líquido en los pediluvios tras el paso de vehículos, y la llegada de visitantes y sus enseres.

Por otro lado, el análisis del aire del interior de granjas también se ha utilizado para evaluar la eficacia de los sistemas de filtración de aire, los cuáles se han comenzado a utilizar en algunas granjas de cerdos durante la última década (Dee *et*

al., 2006). En condiciones de campo, se ha demostrado que la filtración mecánica de aire es completamente eficaz para impedir la entrada del virus PRRS y de *M. hyopneumoniae*, mientras que la filtración antimicrobiana no presenta la misma eficacia (Dee *et al.*, 2010).

1.8.2.4 Evaluación de la eficacia las medidas de limpieza y desinfección (L+D)

Garantizar una limpieza y desinfección correcta de las instalaciones siempre es fundamental: desde prevenir infecciones y el desarrollo de enfermedades hasta facilitar la repoblación de algunas granjas tras un brote de enfermedad (Ford, 1995). En línea con este fin, las muestras ambientales, especialmente las de superficies, son extremadamente útiles para valorar la eficacia de las medidas de limpieza y desinfección, no sólo en las granjas de cerdos, sino también en los vehículos utilizados para el transporte de animales.

Por ejemplo, se ha comprobado que la limpieza en seco no es eficaz para reducir la carga microbiana en las granjas y los vehículos, si no que se requiere de limpieza en húmedo más desinfección, junto a un tiempo de secado a continuación (Dee *et al.*, 2004). Aun así, en condiciones de campo se ha visto que estas medidas no son totalmente eficaces ya que en un pequeño porcentaje de casos los patógenos siguen presentes (Friese *et al.*, 2012; Giacomini *et al.*, 2018). Para minimizar el riesgo de que esto último suceda, se ha sugerido que algunas medidas como incrementar el tiempo de vacío sanitario en las granjas podrían tener un efecto beneficioso que se sumaría al de la limpieza y desinfección. No obstante, la toma de muestras de superficies y su posterior análisis ha demostrado que esta medida extra no tiene ninguna repercusión más allá de la que tiene la limpieza y desinfección inicial (Luyckx *et al.*, 2016).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

2. OBJETIVOS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

En esta Tesis Doctoral se plantearon los siguientes **OBJETIVOS:**

1º Determinar la presencia de PCV2 en diferentes superficies y fómites de las granjas a través de la detección y cuantificación de ADN del virus mediante qPCR en granjas con Enfermedad Sistémica por PCV2, con infección subclínica y en granjas que vacunan a los lechones frente a esta infección.

2º En base a los resultados obtenidos, evaluar las áreas, fómites u otros elementos que puedan tener mayor importancia en el mantenimiento la infección, en su diseminación por la granja o entre granjas, y las implicaciones que estos resultados pueden tener en la epidemiología y el control de la infección por PCV2.

3º Estimar el papel de los operarios de las granjas a medida que se mejora el control de la infección por PCV2.

4º Valorar la utilidad del muestreo del aire y de las superficies de las granjas de cebo como herramienta alternativa al muestreo de un número representativo de cerdos para estimar la situación de la infección por PCV2 en la granja.

5º Determinar las superficies y los puntos más adecuados para la toma de muestras de aire con el objetivo de detectar la infección por PCV2 en el conjunto de cerdos durante la fase de cebo.

6º Estudiar el efecto que provoca la vacunación de los cerdos en su nivel de excreción de PCV2 mediante la detección y cuantificación del virus en muestras de aire y de superficies.

7º Aplicar la detección ambiental de PCV2 para estimar la eficacia de los equipos de protección individual que utilizan de modo convencional los visitantes de las granjas de cebo de porcino y evaluar las medidas de bioseguridad a seguir en las visitas.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

3. ESTUDIO I:

Distribución ambiental de PCV2 en granjas comerciales de producción de porcino

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

3.1 Introducción y Objetivos

La presencia de patógenos en el ambiente es una causa importante de infección y de transmisión de enfermedades (Prieto *et al.*, 2018). La contaminación ambiental adquiere una gran relevancia en granjas en las que conviven animales de diferente edad, ya que ésta condiciona la probabilidad de contagio de ciertas infecciones (Filippitzi *et al.*, 2018). Por tanto, reducir el contacto entre patógenos y animales susceptibles es una medida primordial para evitar la transmisión de infecciones y reducir su prevalencia.

En las granjas de producción en ciclo cerrado, de producción de lechones y de tipo mixto conviven en un único sitio cerdos de diferentes edades, si bien los animales están separados en varias dependencias según su fase productiva. Esta producción en fases tiene entre sus objetivos minimizar la transmisión de patógenos entre cerdos infectados y susceptibles (Harris, 1988). Son muchas las enfermedades infecciosas en las que los animales infectados contaminan el ambiente que les rodea a través de sus secreciones y excreciones; no obstante, este hecho es especialmente relevante en el caso de patógenos con capacidad para permanecer viables durante mucho tiempo, como es el caso del PCV2 (Welch *et al.*, 2006; O'Dea *et al.*, 2008).

Asimismo, los utensilios utilizados en el trabajo diario, así como los propios operarios de las granjas, también están expuestos a los patógenos excretados por los cerdos infectados y también pueden estar involucrados en su transmisión indirecta (Pitkin *et al.*, 2009a; Kim *et al.*, 2017); de hecho, los operarios incluso pueden comportarse como un vehículo de transmisión entre granjas (Nathues *et al.*, 2018). De esta forma, tanto los trabajadores como los utensilios de manejo también pueden tener un papel en las reinfecciones dentro de la propia granja y, sobre todo, en la persistencia de los patógenos. Al igual que se ha mencionado anteriormente, estos hechos adquieren mayor notoriedad en la infección por PCV2 debido a su resistencia en el ambiente.

En los últimos años la vacunación frente a PCV2 ha tenido un papel fundamental en el control de la infección, mejorando además los índices productivos de las granjas (da Silva *et al.*, 2014). La eficacia de la vacunación ha propiciado que esta práctica esté muy extendida en las granjas de producción, motivo por el que la prevalencia de infección se ha reducido drásticamente (Dvorak *et al.*, 2016; Franzo *et al.*, 2016a). De hecho, hay autores que sugieren la erradicación del virus en algunas granjas es posible (Afghah *et al.*, 2017). No obstante, para esto último es primordial conocer el efecto de

la vacunación sobre la excreción de PCV2, y también el papel que pueda tener la permanencia del virus en el ambiente en la epidemiología de esta infección.

Desde hace unos años la toma de muestras en el ambiente ha cobrado más relevancia en el contexto de la prevención y control de procesos infecciosos en la ganadería y se han desarrollado protocolos de muestreo que han permitido avanzar en el conocimiento de la epidemiología de ciertas infecciones (Ribbens *et al.*, 2007; Prickett *et al.*, 2008; Garrido-Mantilla *et al.*, 2019). En el caso del PCV2, este campo se ha estudiado mucho menos que en otras infecciones como por ejemplo el virus del PRRS, el virus de la Diarrea Epidémica Porcina o el virus Influenza, probablemente por la gran eficacia que confieren las vacunas. No obstante, teniendo en cuenta la gran eficacia que aportan estas últimas, la mejora del control de la infección por PCV2 probablemente pase por un mejor conocimiento de su presencia en el ambiente y, sobre todo, por la repercusión que ésta pueda tener en la transmisión y en el mantenimiento de la infección en las granjas.

En base a estos antecedentes los objetivos planteados en este estudio de esta Tesis Doctoral son los siguientes:

1º Determinar la presencia de PCV2 en diferentes superficies y fómites de las granjas a través de la detección y cuantificación de ADN del virus mediante qPCR en granjas con Enfermedad Sistémica por PCV2, con infección subclínica y en granjas que vacunan a los lechones frente a esta infección.

2º En base a los resultados obtenidos, evaluar las áreas, fómites u otros elementos que puedan tener mayor importancia en el mantenimiento la infección, en su diseminación por la granja o entre granjas, y las implicaciones que estos resultados pueden tener en la epidemiología y el control de la infección por PCV2.

3º Estimar el papel de los operarios de las granjas a medida que se mejora el control de la infección por PCV2.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.2 Materiales y Métodos

3.2.1 Condiciones, selección y clasificación de las granjas del estudio

Para la realización de este estudio se emplearon explotaciones de porcino intensivo clasificadas como de Producción de lechones (Real Decreto 306/2020). Se consideraron dos grupos en función de la existencia o no de una pauta vacunal frente a PCV2. No obstante, debido a la dificultad de localizar e incluir granjas sin vacunación se decidió incluir granjas de Producción de tipo mixto (Real Decreto 306/2020) que no vacunasen.

Las condiciones exigidas a las granjas fueron las siguientes:

- Tamaño: para asegurar una homogeneidad del tamaño de granja, sólo se seleccionaron granjas con censos de entre 100 y 500 cerdas reproductoras.
- Situación del PCV2: se estableció una diferenciación para granjas con y sin vacunación frente a PCV2:
  - Sin pauta vacunal: ausencia de vacunación frente a PCV2, tanto en cerdas reproductoras como en lechones, durante al menos los últimos 6 meses, y existencia de infección por PCV2 en lechones a final de fase de transición y/o inicio de cebo.
  - Con pauta vacunal: vacunación frente a PCV2 a las 3 o 4 semanas de vida en los lechones nacidos en la granja.

La búsqueda y selección de las granjas se realizó a través de veterinarios, cooperativas y ganaderos del sector porcino. Cinco granjas sin pauta vacunal frente a PCV2 cumplieron las condiciones establecidas para este grupo y aceptaron participar en el estudio. En cuanto a las que sí vacunaban se visitaron cuatro granjas.

a) Granjas sin pauta vacunal frente a PCV2

Se realizó una primera visita a cada granja para verificar el cumplimiento con los criterios de inclusión. En caso de cumplirlos se realizó una segunda visita dentro de los siete días consecutivos a la primera visita para la toma de muestras ambientales (Figura 26).

En la primera visita se valoró el estado general de los cerdos y la presencia de signos clínicos compatibles con la infección por PCV2 al final de la fase de transición: adelgazamiento progresivo, palidez generalizada de piel, disnea y diarrea (Allan y Ellis, 2000). También se evaluó la presencia de bajas en esta fase o al inicio de cebo. En caso de haberlas, se realizó la necropsia de hasta un máximo de 5 cerdos y se tomaron las siguientes muestras:

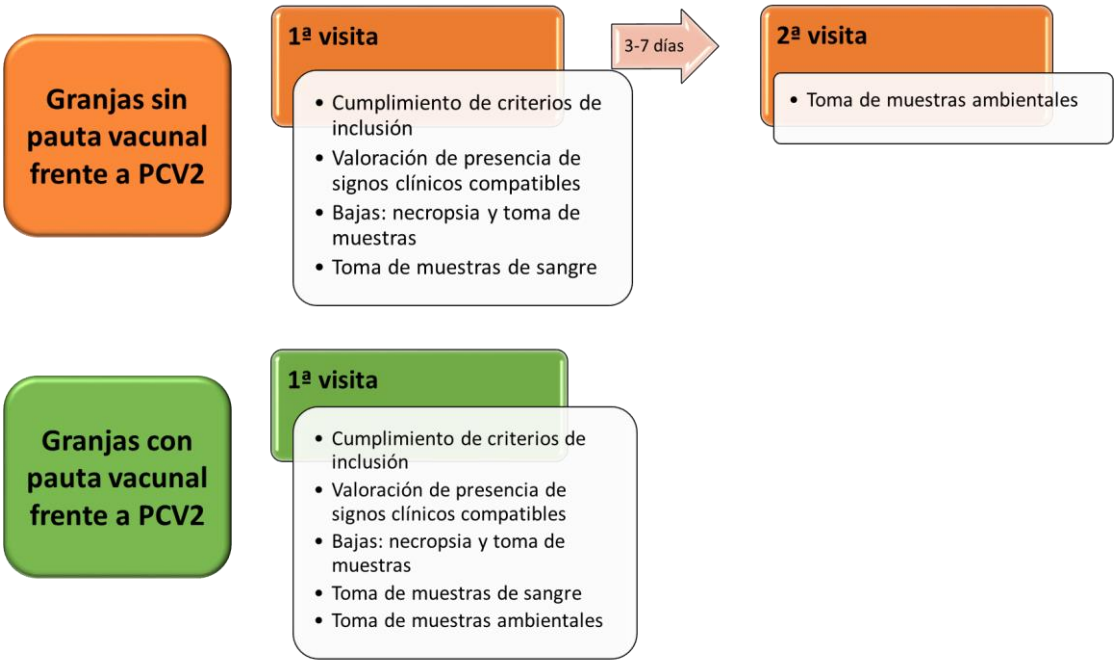


Figura 26. Visitas realizadas a las granjas con y sin vacunación frente a PCV2 y tareas realizadas en cada una.

- Ganglios linfáticos inguinales.
- Bazo.
- Pulmón.

De cada muestra se separaron dos partes para destinarlas a distintos análisis: una se destinó a un análisis histopatológico y se fijó en formol tamponado al 10%; la otra se destinó a un diagnóstico molecular y se mantuvo en refrigeración hasta su llegada al laboratorio, donde se congeló a -30ºC hasta su procesado.

Posteriormente cuando el lote de animales a los que correspondían las bajas finalizó su etapa productiva, se comprobó la tasa de mortalidad y se comparó con la de los lotes precedentes para determinar si se había producido un aumento de mortalidad en el lote estudiado.

En la primera visita también se tomaron muestras de sangre para detectar la circulación de PCV2. Para ello se muestrearon de forma aleatoria 20 lechones de entre 8 y 12 semanas de vida. Este tamaño de muestra permite detectar al menos un cerdo infectado con una probabilidad del 95%, suponiendo que la prevalencia de infección fuese de al menos el 15% (Thrusfield, 2008). La prevalencia esperada se estableció en ese valor ya que estudios previos determinaron que, incluso vacunando, la prevalencia de infección puede estar en torno al 19% (Dvorak *et al.*, 2016). El intervalo de edad seleccionado (8 – 12 semanas de vida) se debe a que éste se considera el momento habitual en el que comienzan a desarrollarse la viremia y los signos clínicos de la infección (Segalés y Domingo, 2002; Carasova *et al.*, 2007; Csank *et al.*, 2013).

La toma de muestras de sangre entera se hizo en la vena yugular externa empleando tubos estériles con anticoagulante BD Vacutainer® K2 EDTA 10,8mg de 6ml. Posteriormente, los tubos se homogeneizaron mediante agitación manual para distribuir el anticoagulante de forma homogénea, y se conservaron en refrigeración hasta su análisis en el laboratorio.

Con esta evaluación y los resultados de las muestras de sangre y de órganos se hizo una clasificación en granjas con Enfermedad Sistémica por PCV2 (PCV2-SD) o con infección subclínica por PCV2 (PCV2-SI). Los criterios para clasificar una granja con PCV2-SD fueron los siguientes (Grau-Roma *et al.* 2011):

- Incremento de mortalidad junto con presencia de signos clínicos compatibles con la enfermedad.
- Diagnóstico individual de PCV2-SD en al menos 1 cerdo de cada 3 – 5 a los que se haga la necropsia. Los criterios para establecer que un animal diagnosticado con PCV2-SD fueron:
    - Presencia de signos clínicos compatibles con la enfermedad.
    - Depleción linfoide e inflamación granulomatosa en más de un tejido linfoide, en un tejido linfoide y uno sistémico, o en dos sistémicos (Opriessnig *et al.*, 2007).
    - Detección de más de 10^8 copias PCV2/g órgano en pulmón, ganglio linfático inguinal y bazo.

En caso de que alguna de las granjas sin pauta vacunal frente a PCV2 no cumpliese alguno de esos dos criterios, pero se demostrase la circulación del virus, se consideró con infección subclínica (PCV2-SI).

b) Granjas con pauta vacunal frente a PCV2

Dado lo extendido de la vacunación frente a PCV2, las granjas que se incluyeron en este estudio presentaban todas un estado sanitario similar (revacunaban frente a PCV2 a las futuras cerdas reproductoras a los 6 meses de vida, antes de su llegada a la granja de producción).

A estas granjas se realizó una única visita. En ellas se comprobó que cumplían los criterios requeridos y se valoró la posible presencia de signos clínicos compatibles con la infección por PCV2 (Allan y Ellis, 2000). También se tomaron muestras de sangre de 20 lechones, del rango de edad y del modo descrito anteriormente con el objetivo de confirmar que la viremia, en caso de haberla, no llegase al menos al 15%. Finalmente, en esta visita también se tomaron las muestras ambientales.

Así, las granjas se clasificaron en tres grupos según su estado respecto a la infección por PCV2: con Enfermedad Sistémica (PCV2-SD), con Infección subclínica (PCV2-SI) o con vacunación de lechones (PCV2-VAC).

3.2.2 Toma de muestras ambientales

El protocolo de muestreo se diseñó considerando las Normas ISO 13307, para la etapa de producción primaria; y ISO 18593, para la toma de muestras a partir de superficies utilizando placas de contacto e hisopos, así como bibliografía previa (Dee *et al.*, 2002; Otake *et al.*, 2002a; Ridley *et al.*, 2011; Espinosa-Gongora *et al.*, 2012; Bangerter *et al.*, 2016; Neira *et al.*, 2016).

Todas las muestras ambientales se tomaron con hisopos de algodón con mango, de 11 milímetros de diámetro (Deltalab S.L., Barcelona, España), previamente esterilizados en autoclave a temperatura de 121ºC durante 30 minutos. El hisopo se frotó por las diferentes superficies a muestrear, en dirección vertical, diagonal y horizontal y rotándolo entre los dedos. A continuación, cada hisopo se introdujo en un tubo de 12 ml (PS Tapado FALDON B/U; Deltalab S.L., Barcelona, España), cortando el mango de madera e identificando el tubo con el nombre de la muestra, que se guardó a temperatura ambiente hasta su llegada al laboratorio. Este método fue seleccionado puesto que previamente ha demostrado su eficacia detectar virus en muestras ambientales procedentes de producciones ganaderas (Prieto *et al.*, 2014).

3.2.2.1 Protocolo de toma de muestras ambientales

Se consideraron muestras de 39 superficies diferentes (se muestran ejemplos de cada muestra en el Anexo I), utilizando un hisopo por cada superficie. El protocolo para la toma de cada muestra ambiental fue el siguiente:

- Comedero de las cerdas: en las salas de partos. Se tomaron muestras de ocho comederos diferentes, seleccionados al azar. En cada uno se delimitó una superficie de 25 x 25 cm (Espinosa-Gongora *et al.*, 2012) con unas plantillas de material maleable, previamente esterilizado.
- Jaula de las cerdas: las muestras se tomaron de las jaulas que correspondían con las mismas cerdas que las muestras de los comederos. Se incluyeron las barras inferiores y posteriores, por el lado interior y por el exterior.
- Área de descanso de los lechones: las muestras se tomaron de las mismas cerdas que las muestras de los comederos y de las jaulas. En cada camada se delimitó un área de 25 x 25 cm.
- Caja de lechones: se incluyó el 50% de la superficie de su interior.
- Pasillos de las salas de partos: se colocaron calzas desechables y se dieron 100 pasos (Norma ISO 13307). A continuación se pasó el hisopo por la superficie ventral de la calza en zigzag desde la punta hasta el talón, y regresando a la punta (Dee *et al.*, 2002).
- Ventiladores de las salas de partos: se incluyeron las aspas o la rejilla protectora de al menos dos ventiladores diferentes.

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

- Caja de utensilios: al igual que se indicó en el epígrafe "caja de lechones", incluyendo en este caso también la superficie de jeringuillas u otros elementos que pudiese haber.
- Tolvas de los lechones: en las salas de transición. Las muestras de ocho tolvas diferentes, como se indicó en el epígrafe "comedero de las cerdas".
- Pared de los corrales de transición: en los mismos ocho corrales que las tolvas de los lechones y siguiendo el mismo protocolo. Se buscó la zona limpia del corral, a la altura del hocico del lechón (Bangerter *et al.*, 2016).
- Suelo de los corrales de transición: correspondiente zona sucia del corral. Como se indica en "pasillos partos".
- Pasillos de las salas de transición: de igual modo que en "pasillos partos".
- Polvo de los tabiques de las salas de transición: parte superior de los tabiques, en zigzag por aproximadamente 1 m de longitud.
- Ventiladores de las salas de transición: como se indicó en "ventiladores de las salas de partos".
- Tolva de las cerdas: en las salas de gestación. Igual que se indicó en "comedero de las cerdas".
- Pared de los corrales de gestación: de igual modo que en la pared de los corrales de las salas de transición.
- Suelo de los corrales de gestación: del mismo modo que en el suelo de los corrales de transición.
- Pasillos de las salas de gestación: como se mencionó en "pasillos de las sala de partos".
- Suelo del almacén: de igual forma que se indicó en "pasillos de la sala de partos".
- Mango de los utensilios: toda la longitud del mango de al menos cinco enseres, empleando al menos diez segundos con cada uno.
- Cazo de alimentación: el asa de al menos tres cazos y al menos el 50% de las vagonetas de alimentación.
- Hidrolimpiadora: al menos el 50% de la superficie.
- Tableros: al menos dos tableros diferentes con el mismo hisopo, muestreando en cada uno al menos el 50% de su superficie.
- Manos de los trabajadores: superficie dorsal y ventral de cada mano, a lo largo de cada dedo, área ventral de las uñas y la región del carpo de un operario (Otake *et al.*, 2002a).
- Fosas nasales: se introdujo aproximadamente 1,25 cm del hisopo en cada fosa nasal (Otake *et al.*, 2002a). El mismo operario que las manos.
- Pelo/Gorro: el hisopo se pasó tres veces por la circunferencia de la cabeza (Otake *et al.* 2002a). Del mismo operario que las manos y las fosas nasales.

- Ropa de trabajo: área del pecho, de la parte delantera y trasera de cada pierna, desde la rodilla al tobillo, y de los antebrazos por completo empleando al menos 15 segundos en cada zona. También del mismo operario.
- Botas de trabajo: la superficie ventral de cada zapato en zigzag desde la punta hasta el talón, y regresando a la punta (Dee *et al.*, 2002). También del mismo operario.
- Ropa de calle: del mismo modo que la "ropa de trabajo".
- Calzado de calle: igual que "botas de trabajo".
- Vehículo: manilla, superficie del volante, pedales y freno de mano, junto con una superficie de 25x25 cm del salpicadero y del asiento del conductor (Ridley *et al.*, 2011).
- Suelo de la oficina: del mismo modo que "pasillos de las salas de partos".
- Pomo de las puertas de la oficina: al menos tres pomos diferentes, empleando diez segundos en la manilla interior y en la exterior (Neira *et al.*, 2016).
- Bolígrafos/Teclado: toda la superficie del teclado del ordenador o al menos cinco bolígrafos diferentes.
- Mesa/Sillas: toda la superficie de una silla (asiento y respaldo) o de la mitad de una mesa.
- Parking: se incluyó el área del parking, charcos y rodaduras de vehículos en el exterior de la granja. Se colocaron calzas desechables con las que se dieron 100 pasos, y a continuación se tomó la muestra igual que se ha descrito anteriormente.
- Entrada principal: igual que "parking", pero dentro del perímetro de la granja en el área que conduce a la entrada principal de la granja.
- Cargadero: igual que "parking", pero por la zona dedicada a la carga/descarga de cerdos, y en la zona donde estaciona el camión durante el proceso.
- Cabestrante del contenedor de cadáveres: todo el área del cabestrante del contenedor.
- Peldaño de los silos: al menos cinco peldaños diferentes de dos silos de almacenamiento de pienso.

3.2.2.2 Clasificación de las muestras ambientales

Las muestras ambientales se corresponden a superficies de distintas dependencias de la granja; como tal, se clasificaron en varias categorías según su área de procedencia. Esta organización se hizo *a priori,* incluyendo cada tipo de muestra ambiental siempre en la misma categoría. En la Tabla 11 se indican las categorías ambientales, así como las muestras que se incluyen en cada una.

Tabla 11. Categorías ambientales establecidas y muestras incluidas en cada una de ellas.

Categoría	Muestras ambientales incluidas			
Sala de Partos (salas con lechones de > 10 días de vida)	Comedero cerda. Jaula cerda.	Área lechones. Caja lechones.*	Pasillos partos. Caja utensilios.	Ventiladores partos.
Sala de Transición (salas con lechones de > 60 días de vida)	Tolva lechones. Pared corral.	Suelo corral. Pasillo transición.	Polvo tabique.	Ventilador transición.
Sala de Gestación	Tolva cerdas.	Pared gestación.*	Suelo gestación.	Pasillo gestación.
Almacén	Suelo almacén. Tableros.	Mango utensilios.	Máquina lavar.	Cazo alimentación.
Trabajadores	Manos. Fosas nasales.	Pelo/Gorro. Ropa trabajo.	Botas trabajo. Ropa calle.*	Calzado calle.* Vehículo.*
Oficina	Suelo oficina.	Pomo puertas.	Mesa/Sillas.	Bolígrafos/teclado.
Perímetro	Parking exterior. Cargadero.*	Entrada principal.	Peldaños silos.	Cabestrante contenedor cadáveres.*

*Muestras que no se utilizaron para comparar los grupos estudiados porque no se pudieron tomar en todas las granjas.

3.2.3 Análisis laboratorial de las muestras

La determinación de la presencia de PCV2 mediante qPCR en todas las muestras disponibles se realizó en el laboratorio de Enfermedades Infecciosas de la Facultad de Veterinaria de Lugo. El análisis histopatológico e inmunohistoquímico de las muestras de órganos se realizó en los laboratorios de Anatomía Patológica de la Facultad de Veterinaria de Lugo y se remitió al servicio de diagnóstico de la Universidad Autónoma de Barcelona respectivamente.

3.2.3.1 Muestras de órganos

Las muestras incluidas en formol tamponado al 10 % se fijaron durante 72 horas y se incluyeron en parafina siguiendo los pasos descritos en la Tabla 12.

A continuación, las muestras en parafina se congelaron a -30ºC durante al menos 24 horas, se cortaron en un microtomo Microm HM 310 (GMI, Minnesota, Estados Unidos) con un grosor de 4 µm, se extendieron en baño – maría a 37 ºC y se fijaron en un portaobjetos. Tras dejarlas secar durante 24 horas a 37 ºC se tiñeron con Hematoxilina – Eosina (H-E) (Tabla 13).

Tabla 12. Pasos, reactivos y tiempos utilizados para la inclusión en parafina

Pasos	Reactivo		Tiempo
Deshidratación	1º (x2)	Formol	1 hora
	2º	Agua	1 hora
	3º	Etanol 70º	2 horas
	4º	Etanol 80º	1 hora
	5º	Etanol 96º	1 hora
	6º	Etanol 100º	1 hora
	7º	Etanol 100º	2 horas
Aclarado	1º (x2)	Xileno	1 hora 30 minutos
Inclusión	1º	Parafina	1 hora
	2º	Parafina	2 horas

Reactivos suministrados por Panreac Química SLU (Barcelona, España)

Tabla 13. Protocolo de tinción Hematoxilina – Eosina.

Pasos	Reactivo		Tiempo
Hidratación de la muestra	1º (x2)	Xileno	10 minutos
	2º (x2)	Etanol 100º	4 minutos
	3º (x2)	Etanol 96º	4 minutos
	4º	Etanol 80º	4 minutos
	5º	Etanol 60º	4 minutos
	6º	Agua corriente	2 minutos
Tinción	1º	Hematoxilina	10 minutos
	2º	Carbonato de Litio	15 segundos
	3º	Eosina	5 minutos
Deshidratación de la muestra	1º	Etanol 60º	1 minuto
	2º	Etanol 80º	1 minuto
	3º (x2)	Etanol 96º	1 minuto
	4º (x2)	Etanol 100º	3 minutos
	5º (x2)	Xileno	10 minutos

Reactivos suministrados por Panreac Química SLU (Barcelona, España)

Finalmente, se fijaron cubreobjetos sobre las muestras con Depex Mounting Medium (VWR, Pensilvania, Estados Unidos) y se secaron a 37 ºC durante 24 horas hasta su visualización en microscopio óptico Leica DM 2500 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania).

A partir de las tinciones de H-E, las muestras de bazo y ganglios linfáticos se consideraron compatibles con la infección por PCV2 cuando cumplieron los criterios establecidos por Opriessnig *et al.* (2004b) y Grau-Roma *et al.* (2009):

- Moderada depleción linfoide y/o pérdida de la estructura folicular.
- Inflamación granulomatosa en al menos un tercio – mitad de los folículos.

A partir de las tinciones de H-E de las muestras de pulmón se comprobó la presencia de neumonía, con presencia de histiocitos y células gigantes multinucleadas en los septos alveolares y áreas peribronquial y peribronquiolar (Segalés y Domingo, 2002; Opriessnig *et al.*, 2004b).

Por otro lado, se hizo una inmunohistoquímica con las muestras de los órganos en los laboratorios de la Universidad Autónoma de Barcelona siguiendo sus protocolos.

En cuanto a las muestras de órganos previamente congeladas se utilizaron para hacer una extracción de ADN utilizando el kit comercial High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) siguiendo las instrucciones indicadas en el mismo (Tabla 14).

La cantidad de PCV2 en las muestras de órganos se expresó como copias PCV2/g órgano (Ecuación 1, Pág. 86).

3.2.3.2 Muestras de sangre

Las muestras de sangre procedentes de los 20 lechones de cada granja se organizaron aleatoriamente en *pools* de cinco animales, siguiendo recomendaciones previas (Cortey *et al.*, 2011b).

La extracción de ADN a partir de los *pools* de sangre se realizó utilizando el kit comercial High Pure PCR Template Preparation Kit, siguiendo las instrucciones indicadas en el mismo (Tabla 14).

La cantidad de PCV2 en los *pools* de sangre se expresó como copias PCV2/ml sangre (Ecuación 2, Pág. 87).

3.2.3.3 Muestras ambientales

Las muestras ambientales se procesaron siempre en las primeras 24 horas tras llegar al laboratorio. El protocolo para la elución de los hisopos fue el siguiente:

1. A cada tubo con el hisopo ambiental se añadieron 5 ml de PBS estéril con 0,05% de Tween 20 (PBS-T).
2. Cada tubo se agitó en posición vertical durante 1 minuto.
3. A continuación, la suspensión se dejó reposar durante 15 minutos en posición vertical.
4. Se transfirió 1 ml de la suspensión a un tubo Eppendorf estéril, que se guardó a -30ºC hasta la extracción del ADN.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Puesto que en este tipo de muestras puede haber sustancias inhibidoras de la PCR, el **protocolo de extracción para las muestras ambientales** se hizo siguiendo el esquema recomendado por Prieto *et al.*, (2017). La extracción de ADN se realizó utilizando dos kits comerciales:

- High Pure PCR Template Preparation Kit.
- Nucleospin® Soil (Macherey-Nagel GmbH, Düren, Alemania).

Todas las muestras se procesaron con el primer kit. El segundo únicamente se empleó con las muestras ambientales que fueron negativas a PCV2 después de hacer la qPCR al ADN obtenido tras la extracción realizada con el primer kit. En ambos casos se siguieron las instrucciones indicadas por el fabricante, añadiendo a cada muestra un ADN control (EXOone EXIC, EXOPOL S.L., Zaragoza, España) para identificar posibles inhibiciones de la qPCR.

El protocolo de extracción de ADN a partir de muestras ambientales con el kit High Pure PCR Template Preparation Kit se indica en la Tabla 14.

Tabla 14. Protocolo de extracción de ADN para el kit High Pure PCR Template Preparation Kit para cada tipo de muestra.

<table>
<tr><th>Sangre</th><th>Órganos</th><th>Ambiental</th></tr>
<tr><td colspan="3">Un tubo Eppendorf estéril por muestra</td></tr>
<tr><td>Preparar pooles: Añadir 40 µl de sangre entera de cada cerdo, hasta un volumen de 200 µl</td><td colspan="2"></td></tr>
<tr><td rowspan="4">Material de inicio: 200 µl</td><td>Material de inicio: 50 mg</td><td>Material de inicio: 200 µl</td></tr>
<tr><td colspan="2">Añadir 200 µl de Tissue Lysis Buffer y 40 µl de Proteinasa K</td></tr>
<tr><td colspan="2">Agitar durante 1 min</td></tr>
<tr><td colspan="2">Incubar a 55ºC durante 1 hora con agitación de 430 x g</td></tr>
<tr><td>Añadir 200 µl de Binding Buffer y 40 ul de Proteinasa K</td><td colspan="2">Añadir 200 µl de Binding Buffer</td></tr>
<tr><td colspan="3">Agitar durante 1 min</td></tr>
<tr><td colspan="3">Incubar a 70ºC durante 10 min con agitación de 430 x g</td></tr>
<tr><td colspan="2"></td><td>Añadir 10 µl de EXOone Exogenous Control</td></tr>
<tr><td colspan="3">Añadir 100 µl de Isopropanol, agitar durante 15 s y dar un pulso de centrífuga hasta 8000 x g</td></tr>
<tr><td colspan="3">Transferir el contenido de cada Eppendorf a una columna de filtrado con su respectivo tubo colector</td></tr>
<tr><td colspan="3">Centrifugar a 8000 x g durante 1 min y desechar el contenido del tubo colector</td></tr>
<tr><td colspan="3">Añadir a cada columna 500 µl de Inhibitor Removal Buffer</td></tr>
<tr><td colspan="3">Centrifugar a 8000 x g durante 1 min y desechar el contenido del tubo colector</td></tr>
<tr><td colspan="3">Añadir a cada columna 500 µl de Wash Buffer</td></tr>
<tr><td colspan="3">Centrifugar a 8000 x g durante 1 min y desechar el contenido del tubo colector</td></tr>
<tr><td colspan="3">Repetir los dos pasos anteriores</td></tr>
<tr><td colspan="3">Centrifugar a 11000 x g durante 3 min y desechar el tubo colector</td></tr>
<tr><td colspan="3">Colocar las columnas en tubos eppendorf estériles y añadir a cada columna 100 µl de Elution Buffer precalentado a 70ºC</td></tr>
<tr><td colspan="3">Incubar durante 1 min a temperatura ambiente, centrifugar a 8000 x g durante 1 min y desechar las columnas</td></tr>
<tr><td colspan="3">Guardar los eppendorf con el ADN extraído a -30ºC hasta realizar la qPCR</td></tr>
</table>

El protocolo de extracción de ADN a partir de muestras ambientales con el kit Nucleospin® Soil fue el siguiente:

1. Preparación de las muestras. Una vez descongeladas, se agitaron durante 1 min y se transfirieron 200 µl de cada elución a un NucleoSpin® Bead Tube.
2. A cada NucleoSpin® Bead Tube se añadieron 700 µL del tampón SL1 y se agitaron en un agitador (BenchMixer™, Benchmark Scientific, Edison, Nueva Jersey, EE.UU.) durante 5 min. Después se centrifugaron a 11000 x *g* durante 2 min.
3. Se añadieron 150 µl de tampón SL3 y se agitaron durante 5 s. Se incubaron a 4ºC durante 5 min y se centrifugaron a 11000 x *g* durante 1 min.
4. Se transfirieron 650 µl del contenido del NucleoSpin® Bead Tube a un NucleoSpin® Inhibitor Removal Column, colocado sobre un tubo Eppendorf; se centrifugaron a 11000 x *g* durante 1 min, desechando los NucleoSpin® Bead Tube.
5. A cada tubo Eppendorf con la muestra se añadieron 250 µl de tampón SB y 10 µL de EXOone Exogenous Control.
6. Los eppendorf se agitaron 15 s y posteriormente se sometieron a un pulso de centrífuga.
7. Se transfirieron 550 µl a un NucleoSpin® Soil Column colocado sobre un tubo colector y se centrifugaron a 11000 x *g* durante 1 min. Se desechó el líquido de los tubos colectores y se repitió el proceso con el resto de la muestra.
8. Se añadieron 500 µl de tampón SB a cada NucleoSpin® Soil Column. Se centrifugaron a 11000 x *g* durante 30 s y se desechó el líquido de los tubos colectores.
9. A cada NucleoSpin® Soil Column se añadieron 550 µl de tampón de lavado SW1, se centrifugaron a 11000 x *g* durante 30 s, se desechó el líquido de los tubos colectores.
10. A cada NucleoSpin® Soil Column se añadieron 700 µl de tampón de lavado SW2. Se agitaron durante 2 s, se centrifugaron a 11000 x *g* durante 30 s y se desechó el líquido de los tubos colectores.
11. Se repitió el proceso anterior para realizar un segundo lavado.
12. Los NucleoSpin® Soil Column con los tubos colectores se centrifugaron a 9000 x *g* durante 3 min.
13. Los NucleosSpin® Soil Column se colocaron en Eppendorf estériles para recoger el ADN.
14. A cada NucleosSpin® Soil Column se añadieron 100 µl de tampón SE precalentado a 80ºC. Se dejaron incubar a temperatura ambiente con las tapas abiertas y a continuación se centrifugaron a 8000 x *g* durante 30 s.
15. Los NucleosSpin® Soil Column se desecharon y los tubos Eppendorf con la elución del ADN se guardaron a -30ºC hasta la realización de la qPCR.

USC
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

La cantidad de PCV2 en las muestras ambientales se expresó como copias PCV2/hisopo (Ecuación 3, Pág. 87).

3.2.3.4 PCR cuantitativa para PCV2

Los ADN extraídos a partir de las muestras de sangre, órganos y muestras ambientales se analizaron mediante qPCR para detectar y cuantificar la presencia de ADN de PCV2. Para ello se empleó un termociclador ABI PRISMR 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems®, California, Estados Unidos) y se utilizó el kit comercial EXOone PCV2 OneMIX (EXOPOL S.L., Zaragoza, España), que detecta genes específicos del ORF2 del virus. El kit está compuesto por los reactivos indicados en la Tabla 15:

Tabla 15. Reactivos del kit EXOone PCV2 OneMix

Referencia	Descripción
PCV2 oneMix	*Máster mix* que contiene buffer, ADN polimerasa y *primers* específicos para la detección de PCV2 y del control endógeno
PRS2	Control positivo para PCV2
Agua	Agua libre de nucleasas

El protocolo de la mezcla para la qPCR fue el siguiente:

1. Preparación de los reactivos: las extracciones de ADN y los reactivos del EXOone PCV2 se retiraron del congelador a -30 ºC y se dejaron a temperatura ambiente hasta que recuperaron el estado líquido.
2. Agitación de los reactivos y extracciones de ADN durante 10 s, seguidos de un pulso de centrífuga.
3. Dispensación de 15 µl de PCV2 oneMIX en cada pocillo de una placa MicroAMP® Optical 96-Wll Reaction Plate Kit Barcode o en pocillos individuales AB-1502 8-tube Strips (Applied Biosystem®, California, Estados Unidos).
4. Adición de 5 µl de la extracción de ADN, del control positivo o del control negativo (agua libre de nucleasas).
5. Cierre de los pocillos individuales o toda la placa con un film adhesivo.
6. Centrifugación de los pocillos o placa a 1400 x *g* durante 1 min en centrífuga Eppendorf Centrifuge 5804 (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania).
7. Colocación de la placa en el termociclador y programación del protocolo térmico (Tabla 16) y de detección del patógeno.
   a. En todos los casos se utilizó como control positivo el proporcionado por el kit y como control negativo agua libre de nucleasas.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 16. Protocolo térmico de la PCR en tiempo real empleada

Número de ciclos	Tiempo	Temperatura
1	5 minutos	95ºC
42	15 segundos	95ºC
	1 minuto	60ºC

La qPCR proporciona dos lecturas de fluorescencia (directamente relacionadas con la cantidad de ADN):

- Canal FAM: detección de ADN de PCV2.
- Canal VIC: detección de ADN del control interno positivo. El control interno detectado fue ß-actina. Este gen está presente en todas las células eucariotas y se utiliza ampliamente como control interno en estudios de biología molecular (Stürzenbaum y Kille, 2001). En las muestras ambientales este ADN es el que se añade con EXOone Exogenous Control.

El umbral a partir del cual se consideró una lectura de fluorescencia como positiva fue establecido en el 5% de la fluorescencia máxima del canal, la cual se obtiene con el Control Positivo. Por tanto, el *Cycle threshold* (Ct) de cada muestra correspondió con el ciclo de la qPCR en el que la fluorescencia del canal FAM alcanzó el 5% de la fluorescencia máxima del Control Positivo.

La interpretación de los resultados se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. No obstante, en el caso de muestras ambientales se decidió incluir como positivas las muestras con Ct ≤ 42, siempre que el Ct del EXOone Exogenous Control estuviese en los valores indicados por el fabricante (Ct 31 +/- 2).

3.2.3.4.1 Construcción de la recta de cuantificación de la qPCR

Para cuantificar el número de copias de PCV2 que se corresponden con cada Ct de la qPCR se construyeron rectas de cuantificación definidas por la siguiente fórmula:

$$y = ax + b$$

Donde y representa el Ct, a la pendiente de la recta, x el logaritmo decimal del número de copias de PCV2 y b la ordenada en origen.

Para la construcción de estas rectas de cuantificación se realizaron qPCR a partir de cantidades de ADN conocido. El control positivo del kit EXOone PCV2, una vez reconstituido, tiene una concentración de 10^5 copias/µl. 50 µl de este control se homogenizaron con 450 µl de agua libre de nucleasas; de esta nueva mezcla se volvieron a tomar 50 µl y se homogenizaron con otros 450 µl de agua molecular, repitiendo este paso otras 2 veces sucesivas para obtener un gradiente de 4 reducciones decimales progresivas (Figura 27).

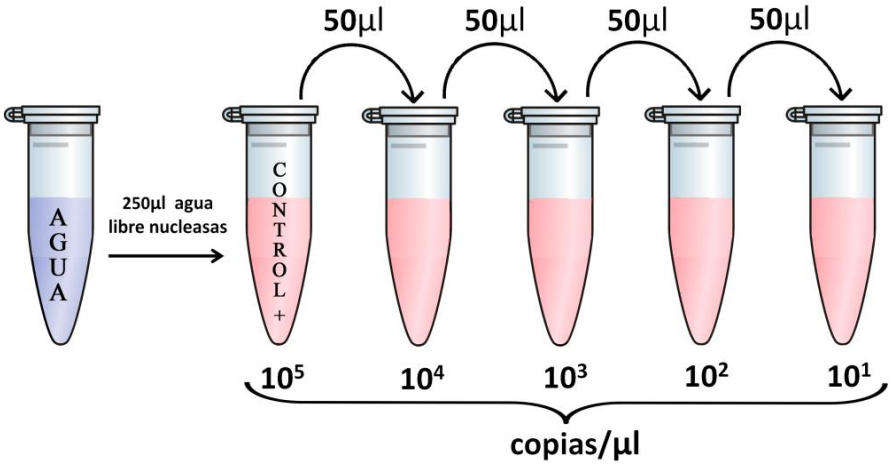


Figura 27. Dilución seriada para elaborar la recta de cuantificación de la qPCR para PCV2

De cada una de estas 5 muestras de concentración conocida se realizaron qPCR siguiendo el protocolo previamente descrito (Pág. 84). Las diluciones que se correspondían con las concentraciones de 10^5 y 10^4 se analizaron por duplicado, mientras que con 10^3, 10^2 y 10^1 se hizo por triplicado.

Para estimar el rendimiento de la qPCR se estimó la eficiencia de la amplificación. Este parámetro indica la proporción en que la amplificación se realiza correctamente. Se estima a partir de la pendiente mediante la siguiente fórmula:

$$Eficiencia = \left(10^{-1/-a} - 1\right) x\ 100$$

Generalmente se considera que valores de eficiencia entre el 90 y el 110 % son aceptables.

Por otro lado, se utilizó el R^2 de la recta patrón para estimar la calidad de la recta para predecir resultados. Los valores superiores a 0,99 indican un muy buen ajuste.

3.2.3.4.2 Cálculo de la cantidad de PCV2 en cada tipo de muestra

Para calcular la cantidad de copias de PCV2 en los *pools* de sangre, las muestras de órganos y las muestras ambientales se emplearon las siguientes ecuaciones:

Ecuación 1

$$Copias\ PCV2/g\ órgano = \frac{copias\ PCV2/reacción * 20}{0{,}05}$$

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Ecuación 2

$$Copias\ PCV2/ml\ sangre = copias\ PCV2/reacción\ * 20 * 5$$

Ecuación 3

$$Copias\ PCV2/hisopo = copias\ PCV2/reacción * 20 * 5 * 5$$

En estas ecuaciones el valor de *copias* PCV2/reacción se obtiene a partir de la recta de cuantificación obtenida. En todos los casos se multiplica por 20 para obtener el número de copias presente en el volumen total de ADN extraído (100 µl), considerando que se usa un volumen de 5 µl en la qPCR (100/5 = 20).

En el caso de las muestras de sangre e hisopos se multiplica por 5, que es la relación entre el volumen utilizado en la extracción (200 µl) respecto a 1 ml de sangre y a la elución del hisopo (1 ml). En el caso de los hisopos el otro 5 es la relación entre la elución del hisopo y el volumen total de PBS-T en que se había agitado (5 ml). En cambio, en las muestras de órganos se divide por 0,05 que es la relación entre la masa de órgano utilizada en la extracción (50 mg) y 1 gramo de tejido.

3.2.4 Análisis estadístico

Para hacer el análisis estadístico se utilizó el software SPSS Statistics v.20 (SPSS Inc. Chicago, EE.UU) y el programa R (R Core Team, 2018).

En el análisis estadístico se emplearon las variables indicadas en la Tabla 17:

Tabla 17. Variables incluidas en el estudio estadístico.

Variables cualitativas	Estatus: PCV2-SD; PCV2-SI; PCV2-VAC.
	Granja: cada granja incluida en el estudio: (A – I).
	Categoría: Partos; Transición; Gestación; Almacén; Trabajador; Oficina; Perímetro.
	Muestra: cada tipo de muestra ambiental.
	Resultado: Positivo; Negativo.
Variables cuantitativas	Copias: número de copias de PCV2/hisopo en cada muestra ambiental positiva.

A partir de las muestras con resultado qPCR positivo, se calculó el porcentaje de muestras positivas para cada granja. Además, para cada estatus (PCV2-SD, PCV2-SI y PCV2-VAC) se calculó la proporción de muestras positivas para cada categoría ambiental.

Las pruebas estadísticas que se utilizaron para contrastar diferencias entre las granjas sin vacunación y entre las granjas con vacunación se indican en la Tabla 18.

Para cada situación sanitaria respecto a PCV2 (PCV2-SD, PCV2-SI y PCV2-VAC), las pruebas estadísticas que se emplearon para contrastar diferencias significativas en la proporción de muestras positivas y en la cantidad de PCV2 en las muestras contaminadas entre las categorías antes mencionadas se indican en la Tabla 19.

Tabla 18. Test estadísticos utilizados en la comparación entre granjas.

	Granjas sin vacunación (PCV2-SD y PCV2-SI)	Granjas con vacunación (PCV2-VAC)
Proporción de muestras ambientales contaminadas	• Test Chi-cuadrado de Pearson[1] • *Odds Ratio*	• Test Chi-cuadrado de Pearson[1] • *Odds Ratio*
Cantidad de PCV2 en las muestras contaminadas	• Anova[2] y prueba *post-hoc* de Scheffé[3]	• Anova Welch[4] y prueba *post-hoc* T3 de Dunnet.

[1] Cuando el resultado fue significativo se hicieron comparaciones pareadas entre granjas para localizar la diferencia significativa. El *p* valor de las comparaciones múltiples se ajustó con la corrección de Bonferroni (R, función *p.adjust*).
[2] Previa comparación de normalidad y homocedasticidad con los test de Shapiro-Wilk y Levene respectivamente.
[3] Se seleccionó este test porque es el más conservador con un número reducido de muestras (Neter et al., 1990).
[4] Se utilizó esta prueba al no mostrar homocedasticidad.

Tabla 19. Pruebas estadísticas utilizadas en la comparación entre categorías ambientales en cada situación sanitaria de PCV2.

	PCV2-SD	PCV2-SI	PCV2-VAC
Proporción de muestras ambientales contaminadas	• Test Exacto de Fisher[1]	• Test Exacto de Fisher[1] • *Odds Ratio*	• Test Exacto de Fisher[1] • *Odds Ratio*
Cantidad de PCV2 en las muestras contaminadas	• ANOVA[2]	• Test Kruskal-Wallis[2] • Test *post-hoc* de Dunn[3]	• Test Kruskal-Wallis[2]

[1] Se empleó este test porque las frecuencias esperadas eran inferiores a 5. Cuando el resultado fue significativo se hicieron comparaciones pareadas entre granjas para localizar la diferencia significativa. El *p* valor de las comparaciones múltiples se ajustó con la corrección de Benjamini-Hochberg (Benjamini and Hochberg, 1995) (R, función *p.adjust*).
[2] Previa comparación de normalidad y homocedasticidad con las pruebas de Shapiro-Wilk y Levene, respectivamente.
[3] Se utilizó para localizar entre qué categorías estaba la diferencia significativa. El *p* se ajustó con la corrección de Bonferroni.

Para comparar la contaminación ambiental entre los casos con PCV2-SD, PCV2-SI y PCV2-VAC se prescindió de las siguientes muestras: caja de lechones, pared de corrales gestación, calzado de calle, ropa de calle, vehículo, cargadero y cabestrante contenedor de cadáveres. Esto se hizo para evitar posibles sesgos en las comparaciones debido a la imposibilidad de tomar alguna muestra en la granja con PCV2-SD. Así, para cada estatus (PCV2-SD, PCV2-SI y PCV2-VAC) se calculó nuevamente la proporción de muestras positivas para cada categoría ambiental.

Las pruebas estadísticas que se utilizaron para contrastar diferencias entre las situaciones sanitarias con PCV2-SD, PCV2-SI y PCV2-VAC, y en la misma categoría entre los distintos estatus se indican en la Tabla 20.

Tabla 20. Pruebas estadísticas utilizadas para la comparación entre estatus y para comparar una misma categoría entre las situaciones sanitarias de PCV2.

	Estatus	Categorías
Proporción de muestras ambientales contaminadas	• Test Chi cuadrado de Pearson[1] • *Odds Ratio*	• Test Exacto de Fisher[4] • *Odds Ratio*
Cantidad de PCV2 en las muestras contaminadas	• Prueba de Kruskal-Wallis[2] • Test *post-hoc* de Dunn[3]	• Prueba de Kruskal-Wallis[2] • Test *post-hoc* de Dunn[3]

[1] Cuando el resultado fue significativo se hicieron comparaciones pareadas entre estatus para localizar la diferencia significativa. El *p* valor de las comparaciones múltiples se ajustó con la corrección de Bonferroni (R, función *p.adjust*)
[2] Se utilizó por no cumplir las condiciones de normalidad y homocedasticidad.
[3] Se utilizó este test para localizar entre qué estatus se localizaba la diferencia significativa. El *p* se ajustó con la corrección de Bonferroni.
[4] Se empleó este test porque las frecuencias esperadas eran inferiores a 5. Cuando el resultado fue significativo se hicieron comparaciones pareadas entre estatus para localizar la diferencia significativa. El *p* valor de las comparaciones múltiples se ajustó con la corrección de Bonferroni (R, función *p.adjust*).

Finalmente, para estudiar la importancia relativa de cada categoría, en cada situación sanitaria se calculó el porcentaje de positivos en cada categoría sobre el total de muestras ambientales en las que se detectó ADN de PCV2. Posteriormente, este valor se ponderó en función del porcentaje que representa cada una de las siete categorías (Sala de partos: 18,75 %; Sala de transición: 18,75 %; Sala de gestación: 9,38 %; Almacén: 15,63 %; Trabajador: 15,63 %; Oficina: 12,50 %; Perímetro: 9,38 %) y se expresó en tanto por ciento.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.3 Resultados y Discusión

3.3.1 Características de las granjas seleccionadas

En el estudio se incluyeron 9 granjas de porcino: 5 sin vacunación frente a PCV2 y 4 que vacunaban a todos los lechones. La descripción de cada granja seleccionada fue la siguiente y se resume en las Tablas 21 y 22:

a) Granjas sin pauta vacunal frente a PCV2

Granja A: granja con sistema productivo mixto y un censo de 175 cerdas reproductoras. Consta de un solo edificio con dos áreas: en una están los vestuarios y la oficina, y en la otra zona están los cerdos: tiene dos salas de gestación, tres de partos, tres salas para la transición, una sala para parte de los cerdos de cebo, y otra zona como almacén.

Granja B: granja de producción de lechones con un censo de 500 cerdas reproductoras, formada por cinco edificios independientes. En uno están la oficina y los vestuarios y, lateralmente, el área de carga. En un segundo edificio se realiza la fase de gestación-cubrición; en otro la maternidad con ocho salas de partos; otro edificio para la fase de transición, compuesta por seis salas; y finalmente las cerdas de reposición se alojan en el edificio restante. Todos los edificios están conectados entre sí mediante caminos y no existe una zona específica dedicada a almacén.

Granja C: granja de producción de lechones con un censo de 200 cerdas reproductoras, formada por cuatro edificios. En un edificio está la fase de maternidad, con tres salas de partos; en un segundo edificio se realiza la fase de transición, también con tres salas; en otro edificio están las cerdas gestantes; y en el último están las cerdas de reposición. A su vez entre los edificios de maternidad y transición tiene una zona dedicada a almacén y, adosado edificio de la reposición, una oficina.

Granja D: granja con sistema de producción mixto y un censo de 500 cerdas reproductoras. La granja tiene cuatro edificios independientes: en el primero están los vestuarios y la oficina; en un segundo edificio, dividido en dos partes, está por un lado una sala de gestación y post-destete, y por otro la zona de partos, divida en ocho salas; en el tercer edificio está la fase de transición, con siete salas; y el último edificio tiene cerdos de cebo. Tiene un almacén en los edificios con la maternidad y la transición.

Granja E: formada por un único edificio, separado en dos zonas: por un lado la oficina y los vestuarios, y por otro la zona de los cerdos. En ésta hay 125 cerdas reproductoras, dos salas de partos y otras dos de transición. Las cerdas gestantes están divididas en dos salas de gestación, entre las cuáles hay un almacén. Tiene una pequeña parte dedicada al cebo de parte de sus lechones, siendo por tanto, su orientación productiva de tipo mixto.

Tabla 21. Descripción de las granjas sin vacunación frente a PCV2.

Granja	A	B	C	D	E
Censo reproductoras	175	500	200	500	125
Nº edificios	1	5	4	4	1
Nº Salas de partos	3	8	3	8	2
Nº Salas de transición	3	6	3	7	2
Nº Salas de gestación	2	1	1	1	1
Almacén	Sí	No	Sí	Sí	Sí
Oficina / Vestuarios	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
Orientación productiva	Mixto	Lechones	Lechones	Mixto	Mixto
Manejo en bandas	Banda semanal	Bandas 3 semanas	Bandas 3 semanas	Banda semanal	Bandas 3 semanas

b) Granjas con vacunación frente a PCV2

Granja F: granja con fases I y II y 360 reproductoras. Consta de tres edificios: uno a la entrada con la oficina y un vestuario; en un segundo edificio están las cerdas en gestación y cubrición; el tercer edificio consta de dos partes, por un lado la maternidad, con seis salas de partos, y por otro la transición, con siete. Entre ambas fases hay un almacén. Vacunaban a los lechones frente a PCV2 a las 4 semanas de vida, y también a las futuras reproductoras a su llegada a la granja.

Granja G: granja de fases I y II, 200 cerdas reproductoras y un edificio. A la entrada hay una oficina. En la zona de los animales, en un extremo hay una sala de gestación, en la parte central seis salas de partos y en el otro extremo cuatro salas de transición. Entre las salas de partos y de transición hay un almacén. Los lechones se vacunan de PCV2 a las 3 semanas; las futuras reproductoras a su llegada a la granja.

Granja H: granja de fases I y II, consta de un solo edificio y 300 cerdas reproductoras. Dispone de una oficina. A la zona de los animales se entra por un almacén; en un extremo del edificio están seis salas de partos, a continuación seis salas de transición y finalmente una de gestación. Los lechones se vacunan frente a PCV2 a las tres semanas de vida; las futuras reproductoras a su llegada a la granja.

Granja I: granja de fases I y II, consta de un edificio y 300 cerdas reproductoras. A la entrada hay una oficina y al lado un almacén. En un extremo del edificio tiene seis salas de partos, en la parte central siete salas de transición y en el otro extremo una sala de gestación. Los lechones se vacunan a las 3 semanas; las futuras reproductoras a su llegada.

Todas llevaban entre 7 y 8 años vacunando frente a PCV2 a todos los lechones.

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

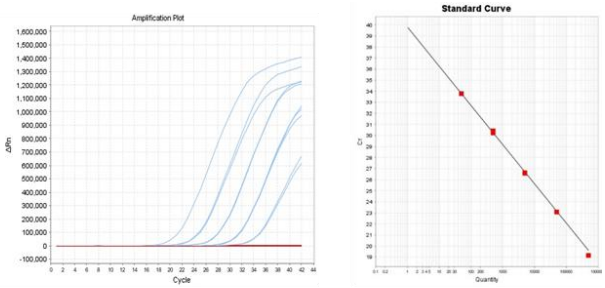
Tabla 22. Descripción de las granjas con pauta vacunal frente a PCV2.

Granja	F	G	H	I
Censo reproductoras	360	200	300	300
Nº edificios	3	1	1	1
Nº Salas de partos	7	6	6	6
Nº Salas de transición	6	4	6	7
Nº Salas de gestación	1	1	1	1
Almacén	Si	Si	Si	Si
Oficina / vestuarios	Si	Si	Si	Si
Orientación productiva	Lechones	Lechones	Lechones	Lechones
Manejo en bandas	Bandas 3 semanas	Bandas 3 semanas	Bandas 3 semanas	Bandas 3 semanas
Pauta vacunal PCV2	Lechones 4 semanas edad	Lechones 3 semanas edad	Lechones 3 semanas edad	Lechones 3 semanas edad
Tiempo vacunando frente a PCV2	7 - 8 años	7 - 8 años	7 - 8 años	7 - 8 años
Vacuna utilizada	Ingelvac CircoFLEX	Ingelvac CircoFLEX	Ingelvac CircoFLEX	Ingelvac CircoFLEX

3.3.2 Rectas de cuantificación de la qPCR de PCV2

Se obtuvieron dos rectas de cuantificación, ambas con un ajuste muy bueno ($R^2 > 0,99$), y una eficiencia de la amplificación del 96,64% para la primera y del 93,05% para la segunda (Figura 28).

y = 42,11 – 3,52x



y = 40,14 – 3,40x

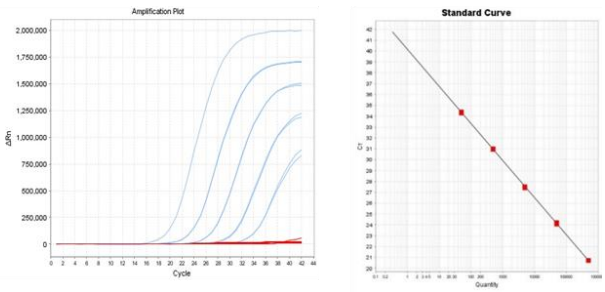


Figura 28. Rectas de cuantificación utilizadas para calcular el número de copias de PCV2 en cada muestra.

3.3.3 Presencia de la infección por PCV2 en las granjas

3.3.3.1 Granjas sin vacunación frente a PCV2

De las cinco granjas que se visitaron, sólo la Granja E presentó signos clínicos compatibles con la infección por PCV2. A su vez, esta granja también fue la única en la que se detectó un incremento de la mortalidad que afectaba a lechones de entre 7 y 10 semanas de vida. De esta granja se realizó la necropsia a tres lechones que habían fallecido en esa franja de edad. En el resto de granjas sin vacunación (Granjas A-D) no se apreciaron signos clínicos compatibles con la infección ni tampoco se reportaron incrementos de mortalidad.

A su vez, en todas las granjas se detectaron cerdos infectados. En todos los *pools* de sangre de la Granja E se detectó ADN de PCV2; en cambio, en las granjas A, B, C y D sólo un *pool* fue positivo a PCV2, y nunca se alcanzó el nivel de la viremia mostrada por los de la Granja E (Tabla 23).

Tabla 23. Resultados de la detección de PCV2 en granjas sin vacunación.

GRANJA	Signos clínicos compatibles	Incremento de mortalidad [a]	Nº *pool* (Edad [b])	Copias PCV2/ml sangre
GRANJA A	No	No	A1 (8 sem)	Neg.
			A2 (8 sem)	Neg.
			A3 (10 sem)	Neg.
			A4 (10 sem)	$9{,}77 \times 10^5$
GRANJA B	No	No	B1 (8 sem)	Neg.
			B2 (8 sem)	Neg.
			B3 (8 sem)	Neg.
			B4 (11 sem)	$1{,}38 \times 10^6$
GRANJA C	No	No	C1 (9 sem)	$1{,}74 \times 10^6$
			C2 (9 sem)	Neg.
			C3 (12 sem)	Neg.
			C4 (12 sem)	Neg.
GRANJA D	No	No	D1 (10 sem)	$1{,}48 \times 10^6$
			D2 (10 sem)	Neg.
			D3 (12 sem)	Neg.
			D4 (12 sem)	Neg.
GRANJA E	Sí	Sí	E1 (8 sem)	$9{,}33 \times 10^8$
			E2 (8 sem)	$4{,}57 \times 10^6$
			E3 (11 sem)	$1{,}62 \times 10^7$
			E4 (11 sem)	$4{,}27 \times 10^6$

[a] Dato aportado por el veterinario/a responsable de la explotación

[b] Semanas de vida de los cerdos que forman el *pool*

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

En cuanto a las bajas muestreadas en la Granja E, dos de los tres lechones analizados (nº 2 y 3) resultaron positivos a PCV2 en alguno de los órganos (Tabla 24). Sin embargo, los resultados presentados por los lechones fueron variables. Las muestras de bazo y de ganglios linfáticos inguinales del lechón nº 2 fueron positivas, pero con una cantidad reducida de PCV2 ($1{,}10 \times 10^4$ y $2{,}51 \times 10^6$), mientras que el lechón nº 3 presentó todos los órganos positivos con valores superiores a 10^8 copias PCV2/g órgano.

Tabla 24. Resultados de la cuantificación de PCV2 en los órganos estudiados mediante qPCR.

ID	Resultado PCR	Copias PCV2/g órgano
G.E. Bazo 1	Negativo	Neg
G.E. Pulmón 1	Negativo	Neg
G.E. Gan. Linf 1	Negativo	Neg
G.E. Bazo 2	Positivo	$1{,}10 \times 10^4$
G.E. Pulmón 2	Negativo	Neg
G.E. Gan. Linf 2	Positivo	$2{,}51 \times 10^6$
G.E. Bazo 3	Positivo	$8{,}49 \times 10^{11}$
G.E. Pulmón 3	Positivo	$3{,}02 \times 10^{12}$
G.E. Gan. Linf 3	Positivo	$2{,}77 \times 10^{12}$

En las Figuras 29, 30, 31, 32 y 33 se muestran las imágenes de la histología y de la inmunohistoquímica de los órganos que fueron positivos en la qPCR. Se observan lesiones compatibles con la infección por PCV2 como la depleción linfoide, inflamación granulomatosa y pérdida de la estructura folicular en el bazo y los ganglios linfáticos inguinales (Figuras 29 y 31), infiltración de histiocitos y presencia de células gigantes multinucleadas (Figura 32 y 33).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

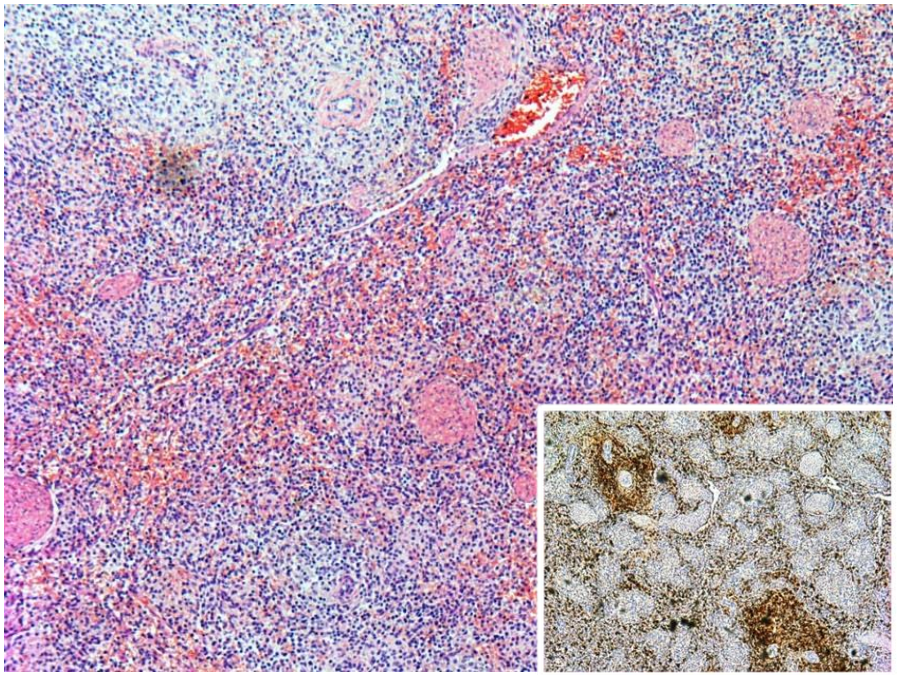


Figura 29. Granja E Bazo 3. Tinción H-E 4x. Severa depleción linfoide con pérdida de la estructura de los folículos linfoides y presencia de un infiltrado de histiocitos. La inmunohistoquímica muestra una abundante cantidad de antígeno de PCV2. Lesión compatible con PCV2 y presencia del virus en el tejido.

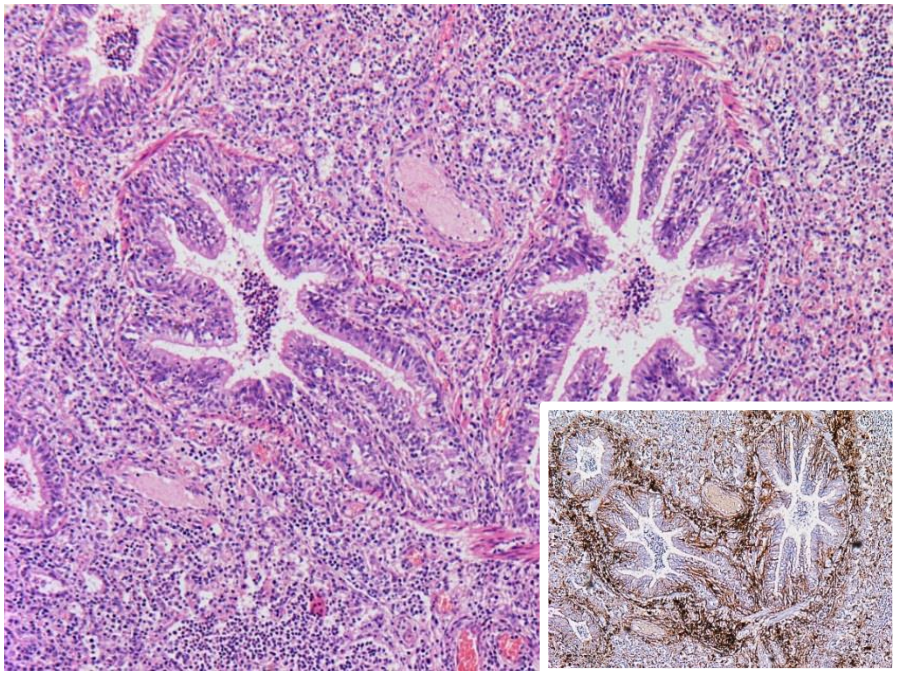


Figura 30. Granja E Pulmón 3. Tinción H-E 4x. Neumonía con infiltración de histiocitos y presencia de células inflamatorias en la luz bronquial. La inmunohistoquímica muestra una abundante cantidad de antígeno de PCV2, localizada principalmente en el área peribronquiolar. Lesión compatible con PCV2 y presencia del virus en el tejido.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

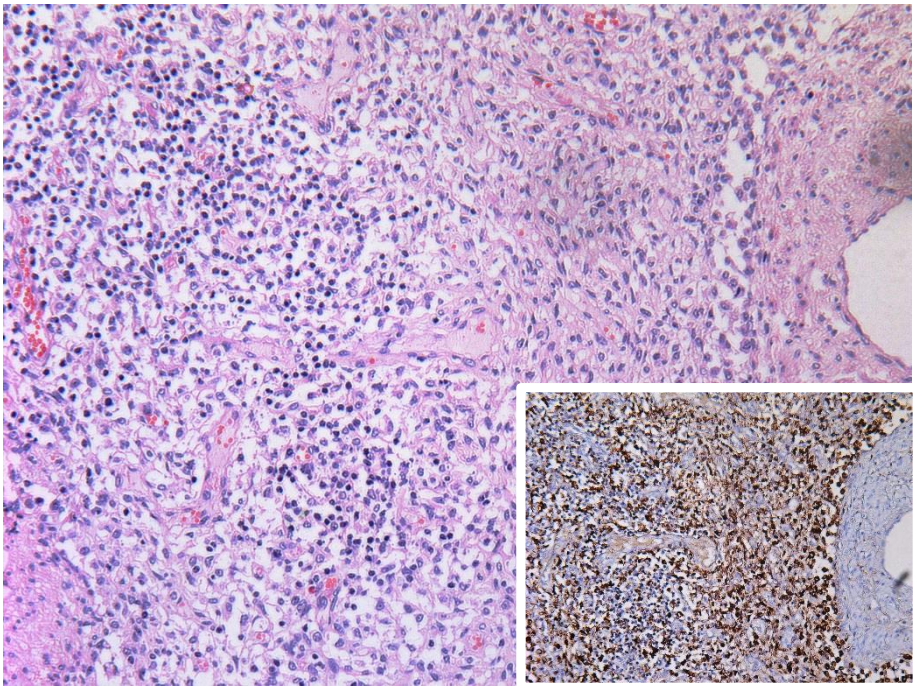


Figura 31. Granja E Ganglio linfático Inguinal 3. Tinción H-E 4x. Severa depleción linfoide con pérdida de la estructura folicular del órgano. Inflamación granulomatosa en el parénquima linfoide. La inmunohistoquímica presenta una gran cantidad de antígeno de PCV2 en este órgano. Lesión compatible con PCV2 y presencia del virus en el tejido.

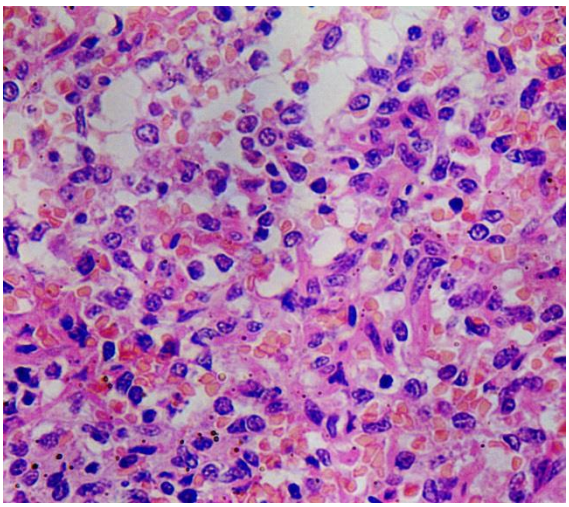


Figura 32. Granja E Bazo 3. Tinción H-E 40x. Presencia de células gigantes multinucleadas e infiltración de histiocitos. Lesión compatible con infección por PCV2.

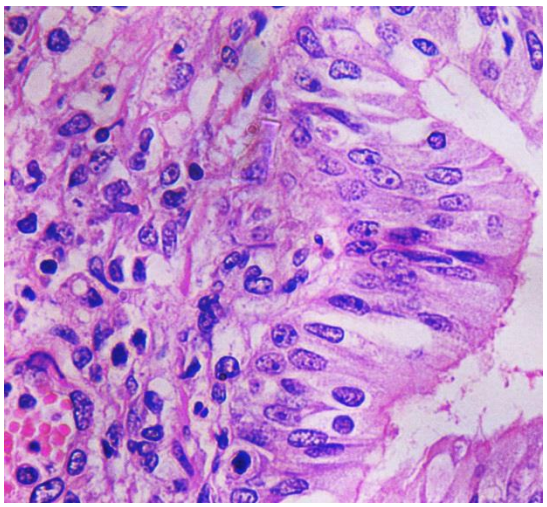


Figura 33. Granja E Pulmón 3. Tinción H-E 40x. Presencia de células gigantes multinucledas y polimorfonucleares. Lesión compatible con infección por PCV2.

Los resultados obtenidos permiten diagnosticar la presencia de la Enfermedad Sistémica por PCV2 (PCV2-SD) en la Granja E, mientras que en el resto de granjas sin vacunar frente a PCV2 se concluyó la existencia una infección subclínica por PCV2 (PCV2-SI).

3.3.3.2 Granjas con vacunación frente a PCV2

Ninguna de las cuatro granjas que vacunaban a los lechones mostró signos clínicos compatibles con la infección por PCV2 ni tampoco manifestaron un incremento de la mortalidad. Además, no se detectó ningún *pool* de sangre positivo a PCV2, lo que sugiere que en ninguna de estas granjas la prevalencia de infección al final de la fase de transición alcanzaba el 15%.

3.3.4 Detección del PCV2 en el ambiente de las granjas

3.3.4.1 Sin vacunación frente a PCV2

Se detectó ADN de PCV2 en las muestras ambientales de las cinco granjas sin vacunación. De un total de 179 muestras ambientales, 73 (40,78%) fueron positivas. En la Tabla 25 se resumen los resultados obtenidos en cada granja sin vacunación.

Tabla 25. Resultados descriptivos de las muestras ambientales en cada granja sin vacunar frente a PCV2.

Granja	nº pos/nº total (% pos)	Promedio*	Desviación típica*	Rango*
A	20 / 39 (51,28 %)	$1,48 \times 10^5$	$2,72 \times 10^5$	$6,84 \times 10^2$ - $9,77 \times 10^5$
B	11 / 34 (32,35 %)	$3,43 \times 10^4$	$1,06 \times 10^5$	$1,70 \times 10^2$ - $3,55 \times 10^5$
C	11 / 39 (28,20 %)	$3,18 \times 10^5$	$4,95 \times 10^5$	$1,66 \times 10^3$ - $1,43 \times 10^6$
D	5 / 36 (13,89 %)	$3,32 \times 10^4$	$6,24 \times 10^4$	$2,82 \times 10^2$ - $1,45 \times 10^5$
E	26 / 31 (83,87 %)	$3,75 \times 10^6$	$9,38 \times 10^6$	$7,59 \times 10^2$ - $4,07 \times 10^7$
Total	73 / 179 (40,78 %)	$1,43 \times 10^6$	$5,80 \times 10^6$	$1,70 \times 10^2$ - $4,07 \times 10^7$

*Expresado como copias de PCV2/hisopo

En la Granja E, la única en que se había diagnosticado PCV2-SD, se detectó un porcentaje de muestras ambientales contaminadas por PCV2 estadísticamente superior que en el resto de granjas, todas ellas con PCV2-SI. Además, la cantidad de PCV2 detectada en las muestras contaminadas también fue mayor de forma estadísticamente significativa que en el resto de granjas, salvo en el caso de la Granja C (Tabla 26). En la Figura 34 se representa la distribución del logaritmo decimal del número de copias de PCV2 en las muestras contaminadas en cada granja.

Tabla 26. Comparaciones pareadas entre granjas sin vacunación. Se subrayan las diferencias significativas.

Granjas comparadas (i / j)	Proporción de muestras positivas a PCV2 (Test Chi-cuadrado)		Media de copias de PCV2 (ANOVA)	
	p-valor ajustado*	ODDS Ratio	Diferencia de medias (i – j)	*p*-valor [α]
A / B	1,000	2,203	0,926	0,246
A / C	0,370	2,681	-0,485	0,821
A / D	0,001	6,536	0,450	0,945
A / E	<0,001	0,202	-1,405	0,001
B / C	1,000	0,821	-1,411	0,049
B / D	0,666	2,967	-0,476	0,949
B / E	<0,001	0,092	-2,331	<0,001
C / D	1,000	2,433	0,935	0,603
C / E	<0,001	0,075	-0,919	0,213
D / E	<0,001	0,031	-1,855	0,016

*Ajuste del *p*-valor utilizando la corrección de Bonferroni

[α] *p*-valor de la prueba *post-hoc* de Scheffé

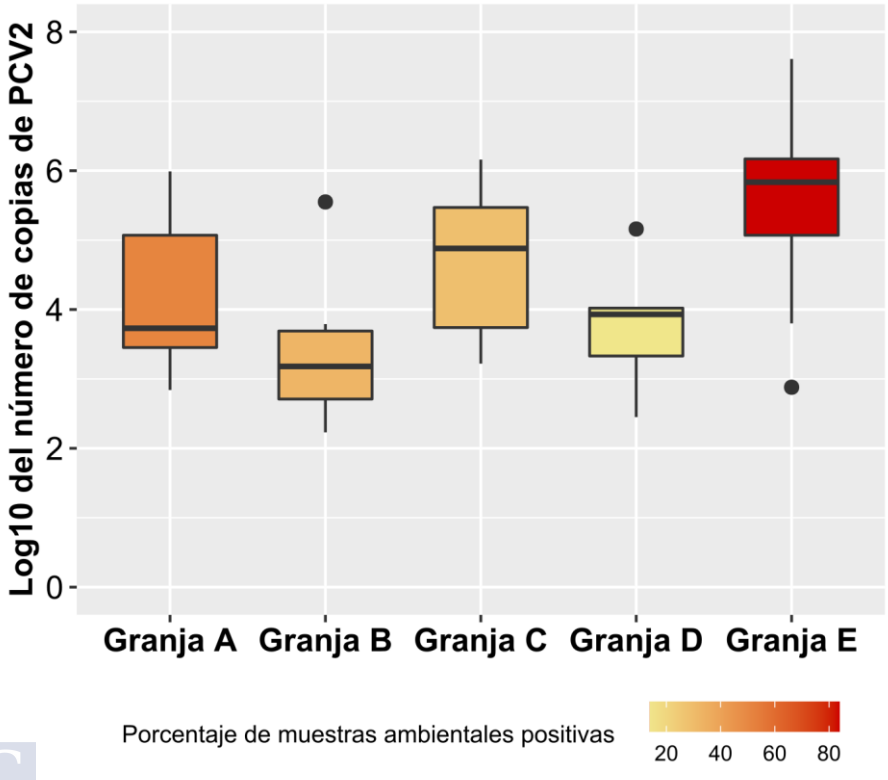


Figura 34. Distribución del logaritmo decimal del número de copias de PCV2 en las muestras positivas en cada granja sin vacunar. El color de las cajas representa el porcentaje de muestras ambientales positivas en cada granja.

Estos resultados muestran que los cerdos no vacunados frente a PCV2 son capaces de producir una considerable contaminación de las superficies e instalaciones de las granjas ambiente, incluso sin existir signos clínicos de enfermedad. Esta elevada contaminación ambiental podría explicar la presencia ubicua y endémica del virus en todas las explotaciones comerciales de porcino.

El mayor porcentaje de muestras ambientales positivas y la mayor carga viral detectada en la Granja E concuerda con que en las granjas con PCV2-SD, la prevalencia de infección, la viremia y la excreción viral son mayores que en las granjas sin signos clínicos (Larochelle *et al.*, 2003; Segalés *et al.*, 2005b; Brunborg *et al.*, 2010), y contribuyen a una mayor presencia del virus en el ambiente de la granja.

En el caso de las granjas con PCV2-SI también se observaron variaciones significativas a pesar de proceder de explotaciones con un estado sanitario similar respecto a esta infección. Probablemente otros factores que no se han controlado en este estudio, como la proximidad de las dependencias en una misma instalación, la ventilación u otros relacionados con el estado sanitario de los cerdos… han podido influir en estos resultados (Dorr *et al.*, 2007; Segalés *et al.*, 2013; Battersby *et al.*, 2016). Así, estos resultados sugieren la necesidad de estudios más amplios que permitan una mejor caracterización de los factores relacionados con la contaminación ambiental por PCV2.

3.3.4.2 Con vacunación frente a PCV2

En las granjas que vacunaban a los lechones frente a PCV2 también se encontró ADN del virus en muestras del ambiente. De 146 muestras ambientales, en 30 se detectó ADN de PCV2, estando presente en todas las explotaciones analizadas (Tabla 27).

La carga vírica de las muestras contaminadas en cada granja se observa en la Figura 35. Destaca la Granja H, en la cual sólo se detectó PCV2 en una muestra ambiental. Esta peculiaridad implicó que en esta granja el porcentaje de muestras ambientales fuera significativamente menor que en las demás, exceptuando la Granja I. Además, no se observaron diferencias significativas en la cantidad de copias del virus en el ambiente de las granjas (Tabla 28).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 27. Resultados descriptivos de las muestras ambientales en cada granja con vacunación frente a PCV2.

Granja	nº pos/nº total (% pos)	Promedio*	Desviación típica*	Rango*
F	10 / 34 (29,41 %)	$2,06 \times 10^4$	$5,41 \times 10^4$	$2,45 \times 10^2$ - $1,74 \times 10^5$
G	12 / 37 (32,43 %)	$2,05 \times 10^3$	$3,37 \times 10^3$	$1,70 \times 10^2$ - $9,12 \times 10^3$
H	1 / 38 (2,63 %)	$2,34 \times 10^2$	-	-
I	7 / 37 (18,92 %)	$4,54 \times 10^6$	$7,96 \times 10^6$	$4,68 \times 10^2$ - $1,95 \times 10^7$
Total	30 / 146 (20,55 %)	$1,07 \times 10^6$	$4,11 \times 10^6$	$1,70 \times 10^2$ - $1,95 \times 10^7$

*Expresado como copias de PCV2/hisopo

Tabla 28. Comparaciones pareadas entre granjas con vacunación. Se subrayan las diferencias significativas.

Granjas comparadas (i / j)	Proporción de muestras positivas a PCV2 (Test Chi-cuadrado)		Media de copias de PCV2 (ANOVA)	
	p-valor ajustado*	ODDS Ratio	Diferencia de medias (i - j)	*p*-valor [α]
F / G	1,000	0,868	0,376	0,629
F / H	0,012	15,384	n.c.	n.c.
F / I	1,000	1,786	-1,442	0,263
G / H	0,006	17,857	n.c.	n.c.
G / I	1,000	2,057	-1,819	0,123
H / I	0,132	0,116	n.c.	n.c.

*Ajuste del *p*-valor utilizando la corrección de Bonferroni

[α] *p*-valor de la prueba *post-hoc* de T3 de Dunnet

n.c. no calculado debido a que en una granja sólo se dispuso de una muestra positiva

Las diferencias observadas en la proporción de muestras contaminadas y cantidad de PCV2 entre las granjas que vacunaban a los lechones sugiere lo ya mencionado en granjas sin vacunación: a pesar de intentar disponer de granjas lo más parecidas posible en instalaciones y manejo, probablemente existieron otros factores que no hemos podido medir y que influyeron en las variaciones que se observan.

La vacunación frente a PCV2 en los lechones mejora los índices productivos, reduce el número de infectados, la viremia y la excreción vírica (Chae, 2012a). Usando programas de vacunación masiva se han podido erradicar algunos virus en las granjas, como por ejemplo el de la Enfermedad de Aujeszky en España (Allepuz *et al.*, 2009); sin embargo, no sucede lo mismo con el PCV2. La detección de PCV2 en el ambiente de este trabajo sugiere que aunque la vacunación reduce la excreción, podría no evitarla totalmente.

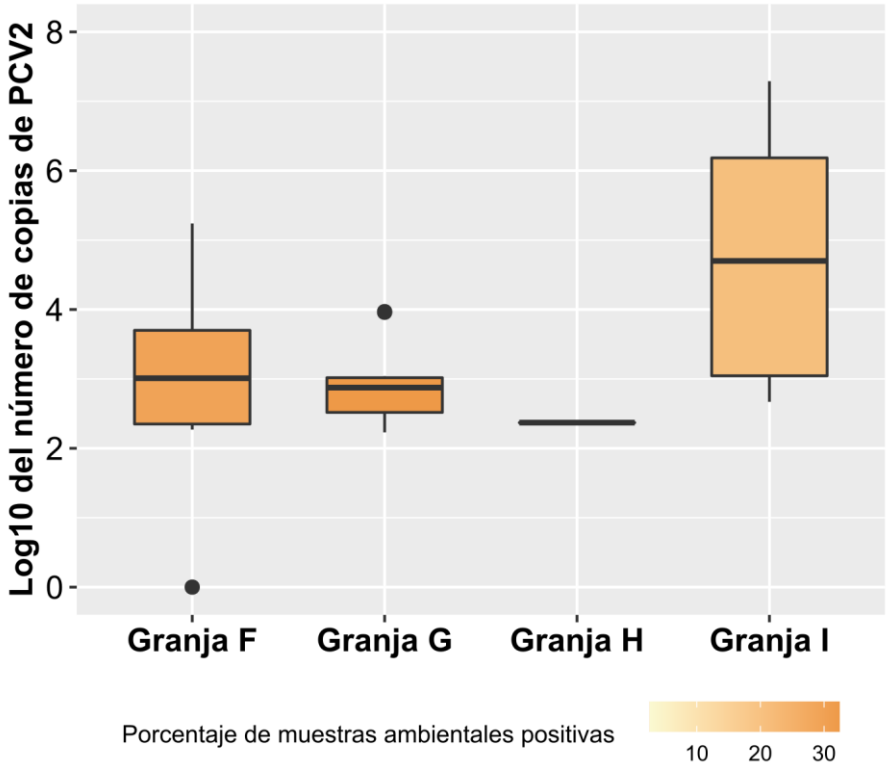


Figura 35. Distribución del logaritmo decimal del número de copias de PCV2 en las muestras positivas de cada granja que vacunaba a los lechones. El color de las cajas representa el porcentaje de muestras ambientales positivas en cada granja.

Se han realizado programas de vacunación masiva que aspiraban a erradicar la infección por PCV2 en las granjas. Por ejemplo, Feng *et al.* (2014) pusieron en marcha en una granja un programa que incluía una vacunación en sábana a todas las reproductoras, verracos y cerdas reposición cada cuatro meses y vacunación de lechones a las 4 y 7 semanas de vida. A pesar de que no se detectaron cerdos infectados al cabo de un año de implementar este programa, tras cesar la vacunación, la circulación del virus se hizo evidente de nuevo, lo que sugirió que el virus no fue completamente erradicado de la granja (Feng *et al.*, 2014). La persistencia ambiental del virus podría ser un factor clave en el fracaso de las medidas de control y erradicación de esta infección en la granja en granja (Horlen *et al.*, 2008). Nuestros resultados son compatibles con esta posibilidad al poner de manifiesto la contaminación ambiental que puede interferir con el éxito de estos programas de vacunación. De hecho, el único caso descrito de una granja que se consiguió mantener libre de PCV2 no lo consiguió utilizando vacunas, sino tras un vacío sanitario y una L+D exhaustiva de todas las instalaciones (Patterson *et al.*, 2011d).

Una limitación de esta técnica para detectar el PCV2 es que la qPCR sólo demuestra la presencia de ADN del virus, no su viabilidad. A pesar de esta limitación, la posibilidad de que el PCV2 detectado en algunas muestras aún fuese infectante parece bastante factible debido a su gran resistencia ambiental (Welch *et al.*, 2006;

Kim *et al.*, 2009); además, a mayor cantidad de copias en una muestra, mayor es la posibilidad de que existan partículas viables (Prieto *et al.*, 2017).

Por tanto, los resultados de este estudio añaden otra variable que se debería controlar al implementar un programa de erradicación de PCV2 en las granjas: su presencia en el ambiente. Así, sería fundamental diseñar un programa de vacunación masivo al mismo tiempo que se hace una L+D completa de todas las instalaciones al menos durante los primeros meses de esta vacunación. Esto debería ir acompañado de una bioseguridad externa muy exhaustiva, monitorizando cada poco tiempo la eficacia de estas medidas. Para ello, la detección ambiental de PCV2 podría ser de utilidad pues permite detectar ADN de PCV2 en el ambiente de las granjas. La detección del virus en estas muestras podría utilizarse como una herramienta de vigilancia para localizar posibles puntos de entrada del PCV2 en las granjas, y también la presencia de posibles subpoblaciones de cerdos infectados.

3.3.5 Descripción de los resultados de detección del PCV2 en muestras ambientales en las distintas enfermedades asociadas a PCV2

3.3.5.1 Sin vacunación frente a PCV2 (PCV2–SD / PCV2–SI)

En la granja con **PCV2-SD** se detectó ADN de PCV2 en 26 de las 31 muestras ambientales que se analizaron (83,87 %), mostrando una alta diseminación en las distintas instalaciones y superficies, con un nivel de contaminación considerable (Tabla 29).

Dos muestras destacaron sobre las demás: el suelo de los corrales y del pasillo de las salas de transición. En ellas se detectó la mayor cantidad de PCV2 (4,07 $x10^7$ y 2,82 $x10^7$ copias/hisopo, respectivamente), siendo las únicas muestras ambientales en las que se superó el umbral de 10 millones de copias por hisopo. Estas muestras se tomaron en salas con lechones afectados clínicamente por PCV2-SD, los cuáles excretan gran cantidad de virus (Segalés *et al.* 2005b; McIntosh *et al.* 2008). Por el contrario, sólo cuatro muestras mostraron resultado negativo: el comedero de las cerdas en las salas de partos, la pared de los corrales en las salas de gestación, distintos elementos de uso de oficina, y los peldaños de los silos.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 29. Número de copias de PCV2 por hisopo en las muestras ambientales de la granja con PCV2-SD. (Adaptado de López-Lorenzo *et al.*, 2019, con licencia CC A 4.0 IL).

Muestra ambiental	Copias PCV2/hisopo	Muestra ambiental	Copias PCV2/hisopo
Comedero de las cerdas	Neg.	Cazo de alimentación	$8{,}13 \times 10^5$
Jaula de las cerdas	$6{,}31 \times 10^3$	Hidrolimpiadora	$1{,}26 \times 10^6$
Área de los lechones	$7{,}59 \times 10^2$	Tableros	$3{,}55 \times 10^6$
Caja de lechones	No muestra	Manos de trabajadores	$1{,}05 \times 10^5$
Pasillos salas de partos	$1{,}48 \times 10^6$	Fosas nasales	$9{,}62 \times 10^3$
Ventiladores de partos	$6{,}46 \times 10^5$	Pelo/Gorro	$3{,}95 \times 10^4$
Caja de utensilios	$1{,}66 \times 10^5$	Ropa de trabajo	$4{,}87 \times 10^5$
Tolvas lechones transición	$7{,}59 \times 10^4$	Botas de trabajo	$2{,}29 \times 10^6$
Pared corrales transición	$1{,}41 \times 10^6$	Ropa de calle	No muestra
Suelo corrales transición	$4{,}07 \times 10^7$	Calzado de calle	No muestra
Pasillos de transición	$2{,}82 \times 10^7$	Vehículo	No muestra
Polvo tabiques transición	$8{,}51 \times 10^6$	Suelo de la oficina	No muestra
Ventiladores de transición	$3{,}31 \times 10^6$	Pomo de las puertas	$3{,}09 \times 10^5$
Tolva cerdas gestación	$2{,}40 \times 10^4$	Bolígrafos/Teclado	Neg.
Pared corrales gestación	Neg.	Mesa/sillas	$7{,}24 \times 10^5$
Suelo corrales de gestación	$1{,}86 \times 10^5$	Parking	Neg.
Pasillos de gestación	$1{,}23 \times 10^6$	Entrada principal	$3{,}80 \times 10^5$
Suelo del almacén	No muestra	Cargadero	No muestra
Mango de utensilios	$1{,}48 \times 10^6$	Contenedor de cadáveres	No muestra
		Peldaños de los silos	Neg.

No muestra indica que una muestra no disponible en esa granja
Neg. indica que no se detectó ADN de PCV2

Se detectó PCV2 en todas las categorías previamente establecidas. Además, excepto la categoría Perímetro, todas mostraron más de un 65 % de muestras positivas (Tabla 30). La proporción de muestras contaminadas fue igual entre todas las categorías ($p = 0{,}106$), aunque destacaron Sala de transición, Almacén y Trabajador, ya que se detectó ADN de PCV2 en todas las muestras que incluían. La cantidad de copias de PCV2 también fue estadísticamente igual entre todas las categorías ($p = 0{,}097$), destacando que todas mostraban una mediana superior a 10^5 copias de PCV2/hisopo, y siendo Salas de transición la que mostró el mayor recuento (Figura 36).

Tabla 30. Resultados descriptivos de las muestras ambientales en cada categoría en la granja con PCV2-SD.

Categoría	nº pos/nº total (% pos)	Promedio*	Desviación típica*	Rango*
Sala de Partos	5 / 6 (83,33 %)	$4,6 \times 10^5$	$6,28 \times 10^5$	$7,59 \times 10^2$ - $1,48 \times 10^6$
Sala de Transición	6 / 6 (100 %)	$1,37 \times 10^7$	$1,68 \times 10^7$	$7,59 \times 10^4$ - $4,07 \times 10^7$
Sala de Gestación	3 / 4 (75,00 %)	$4,80 \times 10^5$	$6,55 \times 10^5$	$2,40 \times 10^4$ - $1,23 \times 10^6$
Almacén	4 / 4 (100 %)	$1,77 \times 10^6$	$1,21 \times 10^6$	$8,13 \times 10^5$ - $3,55 \times 10^6$
Trabajador	5 / 5 (100 %)	$5,86 \times 10^5$	$9,72 \times 10^5$	$9,62 \times 10^3$ - $2,29 \times 10^6$
Oficina	2 / 3 (66,67 %)	$5,17 \times 10^5$	$2,94 \times 10^5$	$3,09 \times 10^5$ - $7,24 \times 10^5$
Perímetro	1 / 3 (33,33 %)	$3,80 \times 10^5$	-	-
Total	26 / 31 (83,87 %)	$3,75 \times 10^6$	$9,38 \times 10^6$	$7,59 \times 10^2$ - $4,07 \times 10^7$

*Expresado como copias de PCV2/hisopo

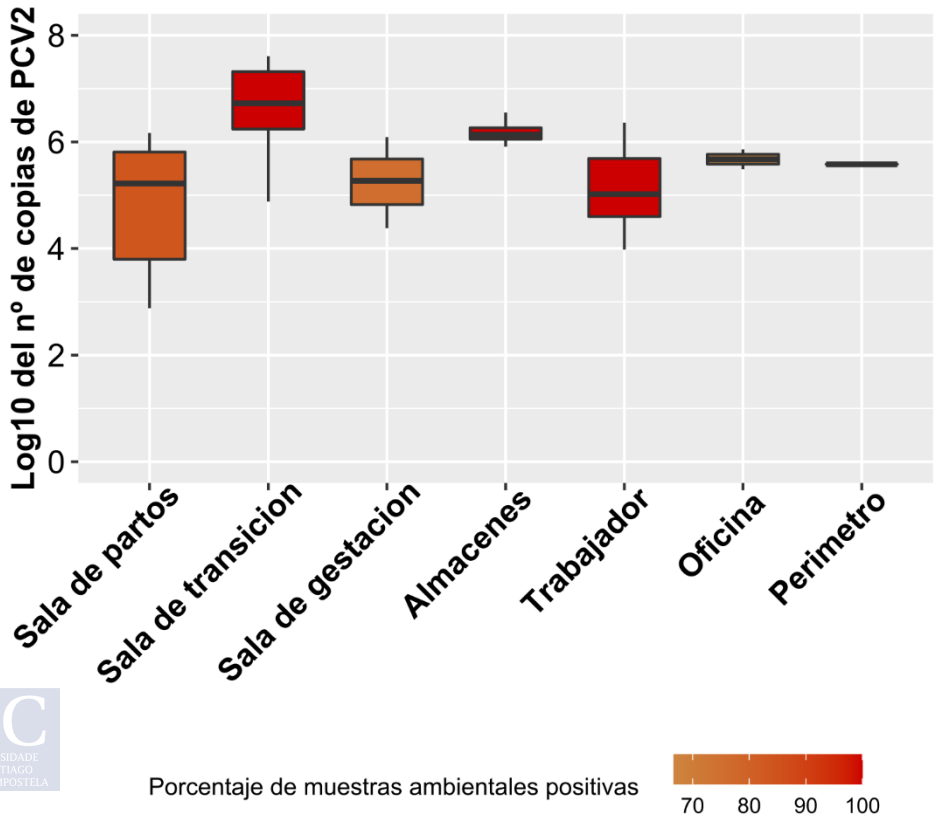


Figura 36. Distribución del logaritmo decimal del número de copias de PCV2 en las muestras positivas de cada categoría en la granja con PCV2-SD. El color de las cajas representa el porcentaje de muestras ambientales positivas en cada granja (Adaptado de López-Lorenzo *et al.*, 2019, con licencia CC A 4.0 IL).

Detectar ADN de PCV2, y en gran cantidad, en el ambiente todas las dependencias de esta granja con PCV2-SD indica que el virus está circulando en todos los grupos de edad (lechones recién nacidos, en transición y en cerdas adultas). El PCV2 que excretan esos animales contamina el ambiente de las áreas de producción; la contaminación de fómites de manejo y de los operarios de la granja provoca su diseminación y, por consiguiente, su detección en el resto de dependencias.

En las granjas con **PCV2-SI** se detectó ADN de PCV2 en 47 de un total de 148 muestras ambientales (31,76 %). Las muestras que fueron positivas en cada granja y la cantidad de PCV2 por hisopo en las mismas se muestran en la Tabla 31.

Tabla 31. Número de copias de PCV2 por hisopo en cada muestra ambiental de cada granja con PCV2-SI (Adaptado de López-Lorenzo *et al.*, 2019, con licencia CC A 4.0 IL).

Muestra ambiental	Granjas con PCV2-SI			
	Granja A	Granja B	Granja C	Granja D
Comedero de las cerdas	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
Jaula de las cerdas	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
Área de los lechones	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
Caja de lechones	Neg.	Neg.	Neg.	No muestra
Pasillos salas de partos	$7{,}08 \times 10^4$	Neg.	Neg.	Neg.
Ventiladores de partos	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
Caja de utensilios	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
Tolvas lechones transición	$5{,}89 \times 10^4$	$9{,}12 \times 10^2$	$6{,}03 \times 10^5$	Neg.
Pared corrales transición	$7{,}76 \times 10^2$	$7{,}76 \times 10^2$	$1{,}05 \times 10^6$	Neg.
Suelo corrales transición	Neg.	Neg.	$1{,}07 \times 10^5$	Neg.
Pasillos de transición	$4{,}79 \times 10^5$	$2{,}45 \times 10^2$	$1{,}45 \times 10^5$	Neg.
Polvo tabiques transición	$9{,}77 \times 10^5$	Neg.	$6{,}92 \times 10^4$	Neg.
Ventiladores de transición	Neg.	$3{,}55 \times 10^5$	$6{,}61 \times 10^3$	Neg.
Tolva cerdas gestación	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
Pared corrales gestación	Neg.	No muestra	Neg.	No muestra
Suelo corrales de gestación	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
Pasillos de gestación	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
Suelo del almacén	$7{,}08 \times 10^5$	No muestra	Neg.	$1{,}05 \times 10^4$
Mango de utensilios	Neg.	No muestra	Neg.	$2{,}14 \times 10^3$
Cazo de alimentación	$2{,}04 \times 10^3$	No muestra	Neg.	Neg.
Hidrolimpiadora	$5{,}75 \times 10^3$	No muestra	Neg.	Neg.
Tableros	$9{,}33 \times 10^4$	Neg.	Neg.	$1{,}45 \times 10^5$
Manos de trabajadores	Neg.	Neg.	$4{,}53 \times 10^3$	Neg.
Fosas nasales	$4{,}08 \times 10^3$	Neg.	Neg.	$8{,}51 \times 10^3$
Pelo/Gorro	$2{,}18 \times 10^3$	$6{,}17 \times 10^3$	Neg.	Neg.

Tabla 31. Continuación

Ropa de trabajo	$2,33 \times 10^5$	$4,07 \times 10^3$	Neg.	Neg.
Botas de trabajo	$2,87 \times 10^5$	$1,51 \times 10^3$	$1,43 \times 10^6$	Neg.
Ropa de calle	Neg.	$5,89 \times 10^3$	Neg.	Neg.
Calzado de calle	Neg.	$2,63 \times 10^3$	Neg.	Neg.
Vehículo	Neg.	Neg.	$7,60 \times 10^4$	No muestra
Suelo de la oficina	$1,74 \times 10^4$	Neg.	Neg.	Neg.
Pomo de las puertas	$3,09 \times 10^3$	Neg.	Neg.	Neg.
Bolígrafos/Teclado	$1,70 \times 10^3$	Neg.	Neg.	Neg.
Mesa/sillas	$5,01 \times 10^3$	Neg.	$1,91 \times 10^3$	Neg.
Parking	$4,16 \times 10^3$	Neg.	Neg.	$2,82 \times 10^2$
Entrada principal	Neg.	$3,39 \times 10^2$	Neg.	Neg.
Cargadero	$4,00 \times 10^3$	$1,70 \times 10^2$	Neg.	Neg.
Contenedor de cadáveres	$6,84 \times 10^2$	Neg.	$1,66 \times 10^3$	Neg.
Peldaños de los silos	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.

No muestra indica que la muestra no estaba disponible o no se pudo tomar
Neg. indica que no se detectó ADN de PCV2 en esa muestra

En estas granjas con PCV2-SI las muestras ambientales que se encontraron contaminadas con ADN de PCV2 en más casos fueron las tolvas de los lechones, las paredes de los corrales de transición, los pasillos de las salas de transición y las botas de trabajo. Estas muestras fueron positivas en tres de las cuatro granjas que se analizaron. Por el contrario, hubo once muestras ambientales en las que no se detectó ADN de PCV2 en ninguna granja (Tabla 31).

En cuanto a la cantidad de copias de PCV2, en el conjunto de las cuatro granjas con PCV2-SI la muestra con mayor cantidad de PCV2 fueron las botas de trabajo. En esa muestra el recuento medio fue de $5,74 \times 10^5$ copias PCV2/hisopo. Las siguientes muestras con mayor cantidad de copias fueron el polvo de los tabiques de las salas de transición ($5,23 \times 10^5$ copias PCV2/hisopo, positiva en dos de las cuatro granjas), el suelo del almacén ($3,59 \times 10^5$, positiva en dos de tres granjas) y la pared de los corrales de transición ($3,49 \times 10^5$, positiva en este caso en tres de las cuatro granjas).

En el conjunto de estas granjas con PCV2-SI destaca la categoría Salas de transición, en la cual en más de la mitad de las muestras (58,33%) se encontró ADN de PCV2. Además, exceptuando la categoría Salas de gestación, se detectó PCV2 en al menos una muestra de cada categoría (Tabla 32).

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

El porcentaje de muestras ambientales contaminadas y la cantidad de PCV2 fue estadísticamente diferente entre las categorías ($p < 0,001$). En concreto, las categorías Salas de Partos y de Gestación mostraron una menor proporción que Sala de

Transición, Almacenes y Trabajadores. En cuanto a la cantidad, sólo el recuento de PCV2 en Salas de Transición fue superior al hallado en Perímetro. En la Tabla 33 y la Figura 37 se muestran los resultados de las comparaciones pareadas, los valores de significación ajustados, las *Odds Ratio* y la distribución que sigue la cantidad de PCV2 en las muestras contaminadas en cada categoría.

Tabla 32. Resultados descriptivos de las muestras ambientales en cada categoría en granjas con PCV2-SI.

Categoría	nº pos/nº total (% pos)	Promedio*	Desviación típica*	Rango*
Sala de Partos	1 / 27 (3,70 %)	$7{,}08 \times 10^4$	-	-
Sala de Transición	14 / 24 (58,33 %)	$2{,}75 \times 10^5$	$3{,}67 \times 10^5$	$2{,}35 \times 10^2$ - $1{,}05 \times 10^6$
Sala de Gestación	0 / 14 (0,00 %)	-	-	-
Almacenes	7 / 16 (43,75 %)	$1{,}38 \times 10^5$	$2{,}57 \times 10^5$	$2{,}04 \times 10^3$ - $7{,}08 \times 10^5$
Trabajador	13 / 31 (41,94 %)	$1{,}59 \times 10^5$	$3{,}95 \times 10^5$	$1{,}51 \times 10^5$ - $1{,}43 \times 10^6$
Oficina	5 / 16 (31,25 %)	$5{,}82 \times 10^3$	$6{,}60 \times 10^3$	$1{,}70 \times 10^3$ - $1{,}74 \times 10^4$
Perímetro	7 / 20 (35,00 %)	$1{,}61 \times 10^3$	$1{,}76 \times 10^3$	$1{,}70 \times 10^2$ - $4{,}16 \times 10^3$
Total	47 / 148 (31,76 %)	$1{,}49 \times 10^5$	$3{,}13 \times 10^5$	$1{,}70 \times 10^2$ - $1{,}43 \times 10^6$

*Expresado como copias de PCV2/hisopo

Tabla 33. Comparaciones pareadas entre las categorías de las granjas con PCV2-SI. Se subrayan las diferencias significativas.

Categorías ambientales (i / j)	Proporción de positivos (Test exacto de Fisher)		Media de copias de PCV2 (Kruskal-Wallis)	
	p-valor ajustado*	*Odds Ratio*	H	*p*-valor [α]
Partos / Transición	< 0,001	0,027	4,179	1,000
Partos / Gestación	1,000	1,038	n.c.	n.c.
Partos / Almacén	0,010	0,049	4,929	1,000
Partos / Trabajador	0,007	0,053	6,846	1,000
Partos / Oficina	0,055	0,084	14,400	1,000
Partos / Perímetro	0,021	0,071	24,143	1,000
Transición/ Gestación	< 0,001	n.c.	n.c.	n.c.
Transición / Almacén	0,757	1,798	0,750	1,000
Transición / Trabajador	0,455	1,938	2,668	1,000
Transición / Oficina	0,223	3,077	10,221	1,000
Transición / Perímetro	0,250	2,597	19,964	0,025

Tabla 33. Continuación				
Gestación / Almacén	0,021	n.c.	n.c.	n.c.
Gestación / Trabajador	0,016	n.c.	n.c.	n.c.
Gestación / Oficina	0,094	n.c.	n.c.	n.c.
Gestación / Perímetro	0,060	n.c.	n.c.	n.c.
Almacén / Trabajador	1,000	1,076	1,918	1,000
Almacén / Oficina	0,899	1,712	9,471	1,000
Almacén / Perímetro	0,899	1,445	19,214	0,131
Trabajador / Oficina	0,757	1,590	7,554	1,000
Trabajador / Perímetro	0,899	1,340	17,297	0,107
Oficina / Perímetro	1,000	1,185	9,743	1,000

*Ajuste del *p*-valor utilizando la corrección de Benjamini-Hochberg
[α] *p*-valor de la prueba *post-hoc* de Dunn
n.c.: no calculado debido a que todas las muestras de al menos una categoría fueron negativas

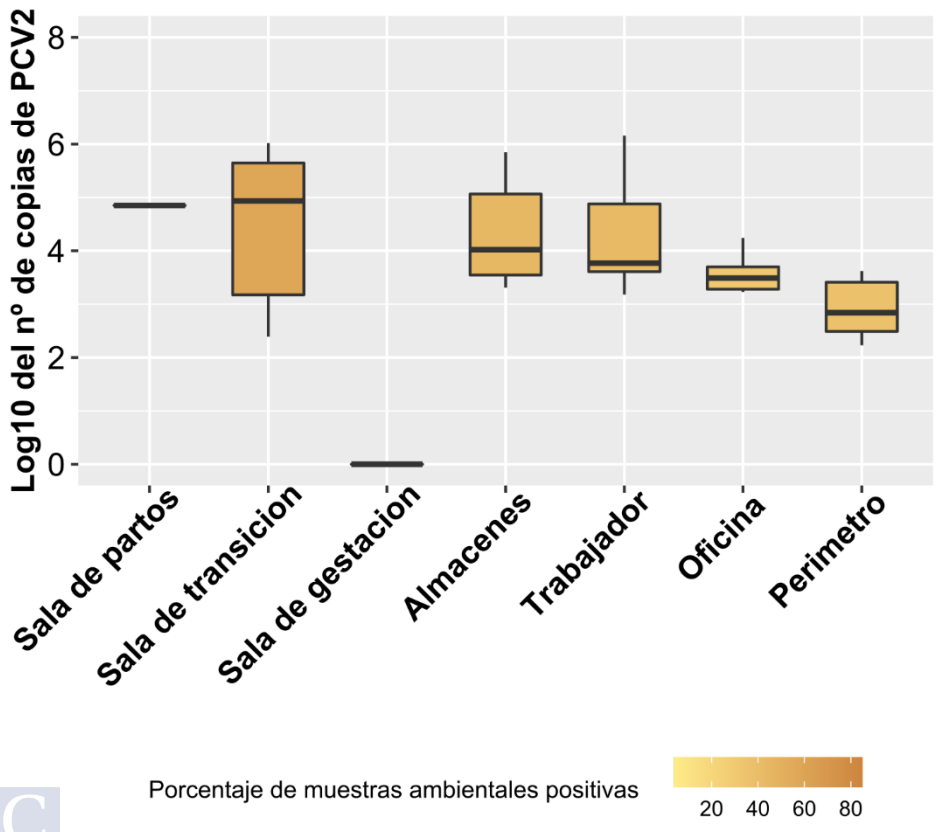


Figura 37. Distribución del logaritmo decimal del número de copias de PCV2 en las muestras positivas en cada categoría en las granjas con PCV2-SI. El color de las cajas representa el porcentaje de muestras ambientales positivas en cada granja (Adaptado de López-Lorenzo *et al.*, 2019, con licencia CC A 4.0 IL).

En la Figura 37 se observa una reducción progresiva de la cantidad de copias de PCV2 en las muestras positivas a medida que se corresponden superficies más alejadas de las dependencias con cerdos y que presentan un contacto más esporádico con los animales y/o sus cuidadores.

En las granjas sin vacunación frente a PCV2 se detectó ADN del virus en el ambiente de todas ellas. Se detectó tanto en salas como con animales como en otras dependencias de la granja en las que no hay cerdos. La excreción de virus por parte de los cerdos infectados (Segalés *et al.*, 2005b) explica su presencia en el ambiente de las salas con animales, mientras que su presencia en otras áreas se debe a la diseminación a través de operarios y fómites.

Respecto a la granja con PCV2-SD (la Granja E), se detectó ADN de PCV2 en una proporción elevada de muestras ambientales, en todas las dependencias y con un recuento medio superior a 10^6 copias por hisopo. Estos valores son indicativos de una infección grave por PCV2, como había sido demostrado. En casos de PCV2-SD la excreción viral es muy elevada (Segalés *et al.* 2005b), lo que explica la gran cantidad detectada en el ambiente. Asimismo, la presencia del virus en el ambiente es otra posible vía de infección, pues implica que los cerdos estén expuestos a una cantidad considerable del virus.

En el conjunto de granjas con PCV2-SI, el porcentaje de muestras ambientales positivas a PCV2 fue inferior al 33%. Excepto en una granja, las dependencias más contaminadas siempre fueron las salas de transición. En una infección típica de PCV2, la excreción del virus suele comenzar al final de esa fase productiva (McIntosh *et al.*, 2008; Prickett *et al.*, 2008; Csank *et al.*, 2013). Este trabajo muestra que en granjas de producción de lechones con PCV2-SI las salas de transición son las dependencias más contaminadas, y desde las que se disemina PCV2 hacia el resto de instalaciones.

En las salas de transición, se detectó PCV2 en todas las muestras ambientales de la granja con PCV2-SD y en la mayor parte de las muestras de granjas con PCV2-SI, exceptuando una. En estas salas, el virus se encontró con más frecuencia en los pasillos, tolvas y paredes de corrales. Estas dos últimas superficies, al igual que el suelo de los corrales, están en contacto exclusivamente con los cerdos, siendo esperable hallar PCV2 en bastantes casos; no obstante, en el suelo sólo se detectó en una granja. Una explicación a este hallazgo sería la estructura de los corrales: mientras que las tolvas y la pared eran sólidas, el suelo era totalmente enrejillado; esto minimiza el área de contacto y facilita la limpieza (Bigeriego *et al.*, 2006). Así, se minimiza la acumulación de excreciones, entre ellas PCV2, detectando el virus en menos casos.

USC
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Nuestros resultados sugieren que el PCV2 en las superficies de las cuadras facilita el contacto entre los lechones alojados conjuntamente. Esto complementa la información aportada por Andraud *et al.*, (2008), donde se señala que el ratio de

reproducción (R_0) de la infección por PCV2 se incrementa cuando los cerdos están en un mismo corral. En este sentido, se ha demostrado que medidas como alojar menos cerdos por cuadra o evitar su mezcla son eficaces para reducir la incidencia de la PCV2-SD (Rose *et al.*, 2003; Andraud *et al.*, 2009b). Por tanto, los resultados de este trabajo muestran el motivo por el que esas medidas son eficaces: de forma indirecta reducen el número de cerdos en contacto indirecto a través de las superficies del corral en las que está el virus, lo que indudablemente tiene un efecto positivo en el control de la infección.

Otras muestras de las salas de transición en las que se detectó PCV2 fueron los ventiladores. Tanto el PCV2 como otros microorganismos están en las partículas de polvo en forma de aerosol (Verreault *et al.*, 2010; Pletinckx *et al.*, 2011), bien procedentes de las vías respiratorias o bien de otras secreciones tras secarse y suspenderse en el polvo (Alonso *et al.*, 2014). Los ventiladores de las salas no se suelen considerar en la L+D (Quiles y Hevia, 2006; Mueller-Doblies *et al.*, 2010). Por un lado, el depósito de polvo en los mismos reduce la eficacia de la ventilación en la granja (Kim *et al.*, 2008); y por otro lado, contribuye contaminar con PCV2 los sistemas de ventilación. Lo observado en este trabajo guarda una línea con información previa: la persistencia de patógenos en los sistemas de ventilación supone un riesgo para posibles infecciones (Friese *et al.*, 2012). Además, el PCV2 en estos elementos implica que al extraer el aire se elimina PCV2 hacia el exterior y, al igual que sucede con virus como el de la DEP o del PRRS (Alonso *et al.*, 2014; Brito *et al.*, 2014), supone un riesgo de infección para las granjas cercanas, especialmente en áreas de alta densidad ganadera. Por tanto, nuestros resultados remarcan que los ventiladores de las salas se deben incluir en las medidas de L+D, especialmente en casos de PCV2-SD.

Un resultado a resaltar fue que en la Granja D no se detectó PCV2 en ninguna muestra ambiental de las salas de transición, ni tampoco de partos ni de gestación. Como se había detectado viremia, surgen dos hipótesis: una infección reciente y por tanto que la presencia del virus en el ambiente todavía insuficiente para detectarla o, que en esta granja haya una inmunidad maternal capaz de proteger a los lechones durante más tiempo (Opriessnig et al., 2004a; Mckeown et al., 2005). Los resultados obtenidos en esta granja sugieren que una L+D eficaz permitiría que los lechones crezcan en un ambiente sin PCV2 lo que, unido a una buena inmunidad maternal, mantiene a los cerdos prácticamente libres de contacto con el virus hasta el cebo.

En las otras dependencias con cerdos, las salas de partos y de gestación, también se detectó PCV2 en el ambiente, aunque casi todas las muestras fueron en la granja con PCV2-SD. En ésta, la mayor parte de las muestras mostraron una gran cantidad de PCV2 lo que sostiene la hipótesis, aun sin tener datos de su posible viremia, de que el PCV2 estaba circulando en esas fases productivas. Si hubiese viremia en las cerdas

gestantes el virus se podría transmitir verticalmente a su descendencia (Shen *et al.*, 2010), siendo esos lechones otra fuente de PCV2 en las parideras.

En las salas de partos de la granja con PCV2-SD se detectó PCV2 en las jaulas de las cerdas y en el área de descanso de los lechones. Este es un hallazgo acorde con el obtenido por Dvorak *et al.* (2013), quienes detectaron el virus en ese mismo tipo de muestras, así como viremia en cerdas y lechones sin encalostrar. Dvorak *et al.*, (2013) no mencionan si en la granja había PCV2-SD, aunque nuestros resultados sugieren que probablemente fuese esa su situación. El PCV2 en estas dos superficies podría proceder del calostro y/o la leche de la cerda, contaminando la parte de la jaula donde se tomaron las muestras (Shibata *et al.*, 2006; Madson *et al.*, 2009c; Gerber *et al.*, 2011). Otra posibilidad es que los lechones que nacen infectados contaminen el área de descanso y durante el amamantamiento, al igual que hacen con las mamas de las cerdas, contaminen la jaula (Garrido-Mantilla *et al.*, 2019).

En las salas de partos también se detectó PCV2 en los pasillos y en los utensilios de manejo postparto. En estas muestras el virus puede proceder de lechones de esas salas pero también ser vehiculado desde otras áreas a través de los operarios, hipótesis que se refuerza por los resultados observados en otras muestras de esa granja: en las manos y la ropa de trabajo se encontró PCV2. Al igual que sucede con virus como el PRRS (Baker *et al.*, 2012), estos resultados sugieren que durante el manejo post-parto, al menos en granjas con PCV2-SD, se podría inocular de forma secundaria PCV2 a los lechones. Esto agravaría la infección en la granja, ya que en los primeros días de vida ya se expondría a esos directamente al virus.

Por tanto, en este estudio se muestra que en granjas con PCV2-SD es posible que los lechones se hallen expuestos a cantidad considerable de PCV2 desde que nacen. Por ello, en estas situaciones la L+D es fundamental desde la lactación; la L+D en elementos de manejo postparto debe ser lo más frecuente posible, recomendando una caja con utensilios de uso exclusivo para cada sala. Así, se minimiza el riesgo de contaminaciones y de transmisión entre bandas de producción.

En cambio, los resultados obtenidos en el ambiente las salas de partos y gestación de las granjas con PCV2-SI sugieren que, en esta presentación de la enfermedad, la excreción de PCV2 en los cerdos de esas fases productivas es prácticamente nula. Esta hipótesis es coherente con los resultados de Eddicks *et al.* (2016) y Dieste-Pérez *et al.* (2018) quienes observaron que ningún lechón en lactación estaba infectado por PCV2 y que la prevalencia en las reproductoras era inferior al 1%. No obstante, en esos dos trabajos, a diferencia del presente, los lechones se vacunaban frente a PCV2 a las 3 – 4 semanas de vida, y en algún caso también las cerdas reproductoras. Posiblemente la vacunación altere la dinámica de la infección y sus resultados estén influidos por las vacunas; en cambio, en este trabajo ninguna granja incluía el PCV2 en los protocolos vacunales por lo que los resultados se deben a la dinámica de la infección natural.

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

No obstante, en una muestra ambiental de las salas de partos se detectó PCV2: el pasillo de la Granja A. Al estudiar esto conjuntamente con las demás muestras, probablemente el virus no proceda de excreciones de los cerdos de esas salas, sino que pudo llegar a través de algún fómite contaminado o de los operarios. De hecho, las botas de trabajo, que tienen contacto directo con el suelo, fueron las muestras contaminadas en más casos y en las que se detectó mayor cantidad de PCV2 en el conjunto de granjas con PCV2-SI.

Un resultado destacable en la granja con PCV2-SD y en el conjunto de granjas con PCV2-SI fue que no hubo diferencia significativa en la proporción de muestras contaminadas ni en la cantidad de PCV2 entre las muestras de Salas de transición (categoría con más contaminación ambiental), Almacén y Trabajador.

Las muestras incluidas en la categoría Almacén son fómites que se usan en el manejo diario. El uso de tableros para mover animales, utensilios para alimentarlos y otros elementos no suele ser exclusivo para cada grupo de edad, su L+D no es frecuente y, tras utilizarse, se almacenan hasta nuevo uso (Casal *et al.*, 2007; Backhans *et al.*, 2015). Asimismo, parte de las muestras englobadas en Almacén están en contacto tanto con los cerdos como con los operarios de modo que ambos pueden ser el origen del virus detectado. Durante el trabajo diario parte del PCV2 que excretan los cerdos o que está en otras superficies se puede depositar en utensilios de trabajo, permanecer en ellos y, cuando se utilizan, alcanzar a otros animales. Al mismo tiempo es otra fuente de contaminación para las manos y ropa de los operarios que los manipulen.

Los resultados de este trabajo muestran que los almacenes, nunca tenidos en cuenta en los programas de control de enfermedades, son dependencias donde el PCV2 se puede acumular y desde las que se puede diseminar hasta a los cerdos u otras áreas de la granja. Por tanto, la L+D de los utensilios de manejo se debe hacer siempre tras su uso. Es recomendable que los tableros de conducción, utensilios de limpieza, de alimentación… sean específicos para cada dependencia de la granja. Usar elementos de distintos colores para cada dependencia es una medida sencilla y que permite diferenciarlos rápidamente, minimizando la diseminación de patógenos.

De modo similar a los almacenes, se detectó PCV2 en todas las muestras de la categoría Trabajador en la granja con PCV2-SD y en más del 40% en las granjas con PCV2-SI. El contacto con cerdos que excretan PCV2 y la presencia del virus en superficies de la granja explican que en las manos, el pelo, la ropa y el calzado se detecte PCV2. Se sabe que los operarios diseminan patógenos con sus movimientos (Allerson *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2017); sin embargo lo más llamativo de estos resultados fue que en las botas de trabajo se encuentra PCV2 en más casos, e incluso en mayor cantidad, que otras en muestras con contacto directo con los cerdos. Se conoce la implicación que tienen las botas de trabajo en la transmisión de otros patógenos que infectan a los cerdos (Dee y Corey, 1993; Otake *et al.*, 2002a; Pitkin *et al.*, 2009a;

Allerson *et al.*, 2013); por tanto probablemente también tengan un papel similar en la transmisión de PCV2. Aunque la qPCR no demuestra la viabilidad del virus (Dewulf *et al.*, 2005), detectar ADN de PCV2 supone un riesgo, más teniendo en cuenta que puede haber 2,29 x10^6 copias de PCV2 en la suela de los zapatos siendo probable que en esa cantidad aun existan partículas viables.

Una recomendación general es usar pediluvios o cambiar de botas antes de entrar a las dependencias de las granjas (Hémonic *et al.*, 2010). Los resultados de este estudio permiten concretar más: en granjas que no se vacuna frente a PCV2 se debería hacer una L+D minuciosa de las botas de trabajo al finalizar las labores en las salas de transición. Además, esto se debería complementar con una organización de la rutina de trabajo, medida básica en los programas de control de cualquier enfermedad, aunque planteada en menos de la mitad de las granjas de producción (Sahlström *et al.*, 2014).

Con la ropa de trabajo sucedió algo similar a lo observado con las botas. Se detectó PCV2 en más de la mitad de las granjas sin vacunación. Los resultados también sugieren que en casos de PCV2-SI la ropa de trabajo se contamina principalmente en las salas de transición. Cambiar la ropa entre las salas de la granja es una medida eficaz para evitar la transmisión de patógenos (Allerson *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2017) pero esto no es práctico en la rutina diaria; de hecho, lo hacen menos de un 10% de las granjas (Madec *et al.*, 2010; Backhans *et al.*, 2015). Sin embargo, usar cada día una ropa diferente sería una medida menos molesta y con una eficacia similar siempre que se acompañe de una orden en la rutina de trabajo. Estos resultados adquieren gran utilidad ya que permiten conocer en qué áreas de la granja es más fácil contaminarse por PCV2. Así podrían ser útiles para organizar la rutina de trabajo más adecuada a cada granja en concreto evitando diseminar el virus y mejorando el control de la infección.

A diferencia de ropa y calzado de trabajo, en las manos sólo se detectó PCV2 en dos granjas sin vacunación. Varios trabajos que remarcan la importancia de la limpieza de manos entre fases de producción (Madec *et al.*, 2010; Backhans *et al.*, 2015; Odo *et al.*, 2015) aunque en este trabajo se observa que otras partes como el pelo o las fosas nasales pueden estar igualmente contaminadas. Usar mascarillas, cubrecabezas o incluso duchas entre fases de producción son medidas a considerar, pero probablemente enfocadas a granjas de orientaciones productivas concretas, como selección o multiplicación.

Como se ha ido comentando, los movimientos de los operarios contribuyen a diseminar el PCV2 por las granjas y éste es probablemente el motivo por el que se detectó el virus en las oficinas. La desviación típica en esta categoría fue más reducida que en otras, lo que indica una fuente de contaminación más homogénea. Las granjas A y E fueron en las que se encontró el virus en más muestras de las oficinas; esas

granjas estaban formadas por un solo edificio, por lo que probablemente la cercanía entre todas las dependencias facilita la contaminación por PCV2.

En este trabajo se detectó PCV2 en la ropa y el calzado de calle. Esta contaminación probablemente se produce al cambiarse la ropa ya que la separación entre zonas "limpias" y "sucias" en los vestuarios es poco frecuente (Simon-Grifé *et al.*, 2013), situación de todas estas granjas. Este protocolo de muestreo se podría utilizar para detectar fallos en la bioseguridad de las granjas: al igual que el PCV2 puede salir de la granja, podría entrar a través de la ropa de calle. Definir los límites de las zonas "limpia" y "sucia" y un correcto protocolo para el cambio de ropa son medidas necesarias para evitar estos fallos de bioseguridad. Instalar barreras sólidas como puertas, un banco cruzado… junto con un sistema de lavado de manos son formas de indicar esa separación.

La contaminación de la ropa y el calzado de calle en algún momento fue el origen del PCV2 detectado en el vehículo del operario de la Granja C. Se debe destacar que las muestras de los vehículos se tomaron del interior de los mismos, donde no se suele hacer L+D (Pritchard *et al.*, 2005; Filippitzi *et al.*, 2018). No obstante, la detección de PCV2 en los vehículos no se debe limitar a los trabajadores de las granjas, sino que cualquier persona que visite una granja conlleva el mismo riesgo. De hecho, ya se había sugerido que los técnicos/veterinarios podrían contribuir a la diseminación geográfica del PCV2 (Vigre *et al.*, 2005). En este trabajo se sugiere que medidas tan habituales como la limpieza de ruedas, arcos de desinfección… tienen una eficacia limitada ya que se demuestra que virus como el PCV2 pueden estar en el interior de los vehículos.

Relacionado con la presencia de PCV2 en los vehículos está su detección en muestras del perímetro. Todos los puntos desde los que se puede acceder a las granjas suponen un riesgo para la entrada o salida de patógenos (Ellis-Iversen *et al.*, 2012). Por ello, las superficies de las que se tomaron las muestras incluidas en perímetro deben ser fáciles de lavar y desinfectar, tarea que se debe hacer frecuentemente. Concretamente, la L+D de estas superficies parece ser más importante en el área de carga y en el contenedor para los cadáveres, ya que fueron las muestras del perímetro en que se detectó PCV2 en más casos. En el caso del contenedor, es importante destacar que las muestras se tomaron del cabestrante, punto de contacto del camión de recogida y del contenedor, por lo que no se puede descartar que el virus procediese del camión. Éstos visitan varias granjas en su rutina diaria, sin limpiarse entre visitas; de hecho se consideran entre las cinco principales causas de introducción virus como el del PRRS a las granjas de producción (Desrosiers, 2011; Nathues *et al.*, 2018). Además la L+D en los contenedores de cadáveres nunca se hace en casi el 75% de las granjas (Filippitzi *et al.*, 2018). Sin embargo, estos resultados remarcan la necesidad de una L+D, tanto en el área de carga como en los contenedores, siempre tras estar en contacto con vehículos ajenos a la granja.

Finalmente se debe comentar un condicionante de las granjas incluidas en este estudio y que pudo influir levemente en los resultados obtenidos. Las granjas A, D y E eran de orientación productiva mixta, teniendo unas dependencias en las que alojaban parte de los cerdos de cebo y, a la vista de los resultados de viremia, probablemente estarían infectados. Aunque para la toma de muestras no se entró en las dependencias que alojaban cerdos de cebo ni se incluyeron muestras de operarios que trabajasen en dicha zona, es probable una excreción de PCV2 por parte de esos animales que también contribuiría a la diseminación del virus. No obstante, a pesar de esta peculiaridad decidimos incluir estas granjas para poder estudiar la epidemiología del virus en el ambiente de granjas con infecciones naturales, dando mayor importancia a que los resultados obtenidos no se viesen influidos por la vacunación.

3.3.5.2 Con vacunación de lechones frente a PCV2

En las granjas que **vacunaban a los lechones** frente a PCV2 se detectó ADN del virus en 30 de 146 muestras ambientales (20,55 %). Los resultados obtenidos en cada granja y en cada tipo de muestra se resumen en la Tabla 34.

Tabla 34. Número de copias de PCV2 por hisopo en cada muestra ambiental de cada granja con PCV2-VAC.

Muestra ambiental	Granjas con PCV2-VAC			
	Granja F	Granja G	Granja H	Granja I
Comedero de las cerdas	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
Jaula de las cerda	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
Área de los lechones	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
Caja de lechones	No muestra	No muestra	Neg.	No muestra
Pasillos salas de partos	$2{,}45 \times 10^2$	Neg.	Neg.	Neg.
Ventiladores de partos	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
Caja de utensilios	No muestra	Neg.	Neg.	Neg.
Tolvas lechones transición	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
Pared corrales transición	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
Suelo corrales transición	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
Pasillos de transición	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
Polvo tabiques transición	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
Ventiladores de transición	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
Tolva cerdas gestación	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
Pared corrales gestación	No muestra	No muestra	No muestra	No muestra
Suelo corrales de gestación	$2{,}63 \times 10^3$	Neg.	Neg.	Neg.
Pasillos de gestación	$1{,}74 \times 10^5$	Neg.	Neg.	Neg.
Suelo del almacén	$9{,}55 \times 10^3$	Neg.	Neg.	$5{,}01 \times 10^4$

Tabla 34. Continuación				
Mango de utensilios	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
Cazo de alimentación	$1,02\ x10^3$	Neg.	Neg.	Neg.
Hidrolimpiadora	No muestra	Neg.	Neg.	Neg.
Tableros	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
Manos de trabajadores	Neg.	$1,02\ x10^3$	Neg.	Neg.
Fosas nasales	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
Pelo/Gorro	Neg.	$1,74\ x10^2$	Neg.	Neg.
Ropa de trabajo	$1,86\ x10^2$	$9,33\ x10^3$	Neg.	Neg.
Botas de trabajo	$1,66\ x10^4$	$3,63\ x10^2$	Neg.	$1,95\ x10^7$
Ropa de calle	Neg.	Neg.	$2,34\ x10^2$	$4,68\ x10^2$
Calzado de calle	$7,76\ x10^2$	Neg.	Neg.	$1,95\ x10^5$
Vehículo	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
Suelo de la oficina	$2,04\ x10^2$	$7,94\ x10^2$	Neg.	$1,20\ x10^7$
Pomo de las puertas	$1,45\ x10^3$	$9,77\ x10^2$	Neg.	Neg.
Bolígrafos/Teclado	Neg.	$7,08\ x10^2$	Neg.	Neg.
Mesa/sillas	Neg.	$9,12\ x10^3$	Neg.	Neg.
Parking	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
Entrada principal	Neg.	$1,70\ x10^2$	Neg.	$8,13\ x10^2$
Cargadero	No muestra	$2,45\ x10^2$	Neg.	$1,51\ x10^3$
Contenedor de cadáveres	Neg.	$1,10\ x10^3$	Neg.	Neg.
Peldaños de los silos	Neg.	$6,46\ x10^2$	Neg.	Neg.

No muestra indica que la muestra no estaba disponible
Neg. indica que no se detectó ADN de PCV2 en esa muestra

En muy pocas muestras ambientales de las superficies en contacto con cerdos se detectó ADN de PCV2. En cambio, las muestras más frecuentemente contaminadas fueron las botas de trabajo y el suelo de las oficinas, positivas en tres de las cuatro granjas, siendo las muestras que en el conjunto de granjas mostraron mayor promedio de copias por hisopo: $1,13\ x10^7$ y $6,94\ x10^6$ respectivamente. A pesar de que ninguna granja presentaba signos clínicos compatibles, una prevalencia de infección inferior al 15% en lechones de transición y que todas llevaban entre 7 y 8 años vacunando a todos los lechones, estos resultados confirman la ubicuidad del PCV2.

Exceptuando Salas de transición, hubo muestras ambientales positivas a PCV2 en todas las categorías. El mayor porcentaje de muestras contaminadas se localizó en las muestras tomadas en la Oficina (43,75%), seguida de las incluidas en la categoría Trabajador (34,38%) (Tabla 35).

Tabla 35. Resultados descriptivos de las muestras ambientales en cada categoría en las granjas con PCV2-VAC.

Categoría	nº + /nº tot. (% pos)	Media*	Desviación típica*	Rango*
Sala de Partos	1 / 24 (4,17 %)	$2,45 \times 10^2$	-	-
Sala de Transición	0 / 24 (0,00 %)	-	-	-
Sala de Gestación	2 / 12 (16,67 %)	$8,82 \times 10^4$	$1,21 \times 10^5$	$2,63 \times 10^3$ - $1,74 \times 10^5$
Almacenes	3 / 19 (15,79 %)	$2,02 \times 10^4$	$2,62 \times 10^4$	$1,02 \times 10^3$ - $5,01 \times 10^4$
Trabajador	11 / 32 (34,38 %)	$1,79 \times 10^6$	$5,87 \times 10^6$	$1,74 \times 10^2$ - $1,95 \times 10^7$
Oficina	7 / 16 (43,75 %)	$1,72 \times 10^6$	$4,54 \times 10^6$	$2,04 \times 10^2$ - $1,20 \times 10^7$
Perímetro	6 / 19 (31,58 %)	$7,47 \times 10^2$	$5,12 \times 10^2$	$1,70 \times 10^2$ - $1,51 \times 10^3$
Total	30 / 146 (20,55 %)	$1,07 \times 10^6$	$3,13 \times 10^5$	$1,70 \times 10^2$ - $1,95 \times 10^7$

*Expresado como copias de PCV2/hisopo

La proporción de muestras ambientales positivas a PCV2 fue diferente ($p < 0,001$) entre las categorías. Trabajador y Oficina mostraron estadísticamente mayor proporción de muestras contaminadas que Salas de Partos y Sala de Transición (con esta última también mostró mayor proporción Perímetro). Los resultados de las comparaciones pareadas entre categorías y las *Odds Ratio* correspondientes se resumen en la Tabla 36.

En cuanto a la cantidad no se observó diferencia significativa entre las categorías ($H = 5,953$; $p = 0,311$). No obstante, parece haber una tendencia decreciente en el número de copias de PCV2 según las muestras se alejan de los animales (Figura 38). Se debe tener en cuenta que los resultados de Sala de gestación se correspondieron sólo con una granja.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 36. Comparaciones pareadas entre las distintas categorías de las granjas con PCV2-VAC. Se subrayan las diferencias significativas.

Categorías ambientales (i / j)	Proporción de positivos (Test exacto de Fisher)		Media de copias de PCV2 (Kruskal-Wallis)	
	p-valor ajustado*	ODDS Ratio	H	*p*-valor
Partos / Transición	1,000	-	n.c	n.c
Partos / Gestación	0,437	0,217	n.c	n.c
Partos / Almacén	0,484	0,232	n.c	n.c
Partos / Trabajador	0,033	0,083	n.c	n.c
Partos / Oficina	0,021	0,056	n.c	n.c
Partos / Perímetro	0,115	0,094	n.c	n.c
Transición/ Gestación	0,275	-	n.c	n.c
Transición / Almacén	0,237	-	n.c	n.c
Transición / Trabajador	0,010	-	n.c	n.c
Transición / Oficina	0,010	-	n.c	n.c
Transición / Perímetro	0,021	-	n.c	n.c
Gestación / Almacén	1,000	1,066	n.c	n.c
Gestación / Trabajador	0,602	0,382	n.c	n.c
Gestación / Oficina	0,425	0,257	n.c	n.c
Gestación / Perímetro	0,602	0,433	n.c	n.c
Almacén / Trabajador	0,420	0,358	n.c	n.c
Almacén / Oficina	0,308	0,241	n.c	n.c
Almacén / Perímetro	0,602	0,406	n.c	n.c
Trabajador / Oficina	0,636	0,673	n.c	n.c
Trabajador / Perímetro	1,000	1,135	n.c	n.c
Oficina / Perímetro	0,621	1,686	n.c	n.c

*Ajuste del *p*-valor utilizando la corrección de Benjamini-Hochberg

n.c no calculado al no hallar diferencias significativas en la prueba de Kruskal-Wallis

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

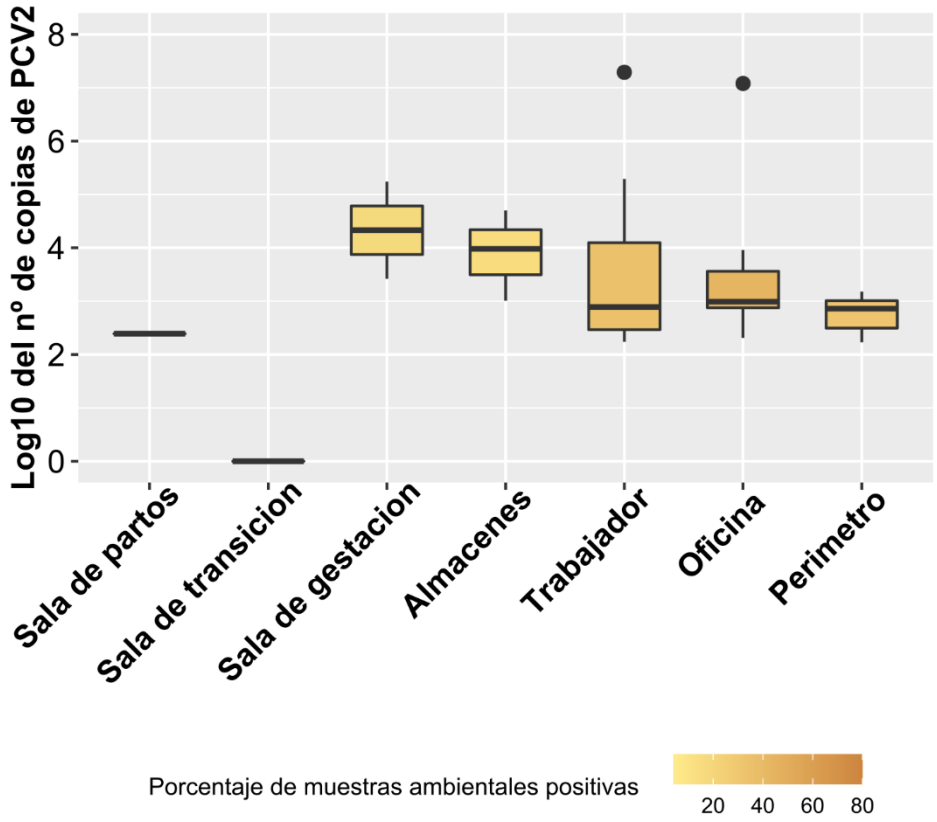


Figura 38. Distribución del logaritmo decimal del número de copias de PCV2 en las muestras positivas de cada categoría en las granjas PCV2-VAC. El color de las cajas representa el porcentaje de muestras ambientales positivas en cada granja.

Vacunar a los lechones es la medida más habitual y eficaz para controlar la Enfermedad Sistémica por PCV2, reducir la viremia, su duración y mejorar los índices productivos (Beach y Meng, 2012; Chae, 2012a; Segalés, 2015). La vacunación continuada ha provocado un cambio en la epidemiología de la infección por PCV2, retrasando el momento en que aparece la viremia hasta una edad próxima al sacrificio de los cerdos, o bien cuando se introducen las cerdas de reposición (Haake *et al.*, 2014; Feng *et al.*, 2016; Segalés, 2016). Esto último también puede conllevar, en casos puntuales, una aparición temprana de la infección, en lechones de 4 – 5 semanas de vida, la cual se podría confundir con fallos vacunales (Figueras *et al.*, 2016).

En línea con esa información, en este trabajo no hemos detectado PCV2 en ninguna muestra del ambiente de las salas de transición, ni tampoco viremia, lo que indica que probablemente en ninguna de esas granjas había casos de infección temprana. Los resultados exponen que una pauta adecuada de vacunación en lechones frente a PCV2 evita la circulación vírica durante la etapa de transición.

Estos resultados muestran un punto especialmente interesante: a pesar de llevar años vacunando a todos los lechones se detecta PCV2 en el ambiente de esas granjas.

Su resistencia favorece su persistencia (Welch *et al.*, 2006). Así es posible que el ADN del virus que se detectó en algunas muestras, por ejemplo en el suelo de los almacenes, permaneciese desde que en las granjas había una situación similar a la observada en los casos de PCV2-SI o PCV2-SD. Esto es posible ya que la qPCR sólo detecta la presencia de ADN, nunca su viabilidad (Dewulf *et al.*, 2005).

En las salas de partos y de transición sólo se detectó ADN de PCV2 en una muestra ambiental de una granja: el pasillo de las salas de partos. Estos resultados sugieren un nivel de infección casi nulo en esas fases productivas, resultado coherente con la baja prevalencia de infección en los granjas que vacunan a los lechones (Eddicks *et al.*, 2016; Oliver-Ferrando *et al.*, 2016; Dieste-Pérez *et al.*, 2018). En cambio, en las salas de gestación se detectó PCV2 en dos muestras ambientales de una granja (la misma granja que la muestra positiva del pasillo de las salas de partos). La cantidad de copias de PCV2 que se detectó en las muestras de las salas de gestación sugiere que en el momento había, al menos en la gestación, cerdas infectadas.

En general, las cerdas adultas tienen una inmunidad capaz de protegerlas de la infección por PCV2 (Calsamiglia *et al.*, 2007; Oliver-Ferrando *et al.*, 2018b); no obstante, esta situación puede ser distinta en las cerdas de reposición y/o en las nulíparas. Las cerdas de reposición generalmente se vacunan a las 3 – 4 semanas de vida, lo que les confiere una protección durante aproximadamente 20 semanas (Fichas técnicas Circovac, IngelVac CircoFLEX, Myosphere PCV, Porcilis PCV, Suvaxyn Circo). A la edad que las cerdas de reposición entran en el ciclo reproductivo esa inmunidad vacunal ya ha desaparecido, siendo susceptibles de infectarse (Madson y Opriessnig, 2011; Feng *et al.*, 2016; Eddicks *et al.*, 2018; Oliver-Ferrando *et al.*, 2018a). La toma de muestras que se hizo en el suelo de las cuadras de gestación incluyó 100 pasos por diferentes corrales. En base a la información de esos trabajos, nos planteamos que posiblemente en alguna de esas cuadras habría cerdas nulíparas o de primer parto infectadas y excretando PCV2 en esa sala. Curiosamente se detectó mayor cantidad en el pasillo de las salas de gestación que en el suelo de las cuadras. Esto puede deberse a una razón ya explicada en las granjas con PCV2-SI y PCV2-SD: el suelo con rejillas reduce la acumulación de excreciones, a diferencia del suelo sólido del pasillo (Bigeriego *et al.*, 2006). Además, la contaminación en el pasillo de las salas de gestación es posible que se incremente con el tiempo ya que en estas salas no suele haber un manejo todo dentro-todo fuera, y la L+D es menos habitual que en otras dependencias.

En el caso concreto de la Granja F, el PCV2 presente en los pasillos de las salas de gestación probablemente sea el origen del PCV2 detectado en el pasillo de las salas de partos. Sostiene esta hipótesis que la cantidad detectada en este último fue menor que la detectada en las salas de gestación, siendo posible que el virus se diseminase con las cerdas en preparto que se llevasen para las maternidades o, más factible con el

resto de resultados, a través de los movimientos de los operarios de esa granja, puesto que tanto en la ropa como en las botas de trabajo había PCV2.

Por otro lado, estos resultados ayudan a comprender un poco mejor otro aspecto de la epidemiología de PCV2: las infecciones tempranas (Figueras *et al.*, 2016). Éstas se han descrito en casos puntuales de granjas que vacunan a los lechones, considerándose de gran importancia las cerdas nulíparas que nunca han tenido contacto con el PCV2, pues apenas tendrán anticuerpos y tras el parto transmitirán una inmunidad maternal prácticamente nula frente al PCV2 (Opriessnig *et al.*, 2011b; Eddicks *et al.*, 2016). En este trabajo se muestra que las manos, la ropa y el calzado de trabajo de los cuidadores pueden portar PCV2. Así, durante las tareas del postparto, cuando el contacto entre operario y lechón es más frecuente y cercano, de forma indirecta se estaría exponiendo al virus de esos lechones susceptibles. De esta forma, los resultados de este trabajo sugieren otro factor que, muy probablemente, influye en la aparición de infecciones tempranas por PCV2. Este sería un posible estudio que diseñar y realizar en el futuro a partir de los hallazgos de este trabajo.

Centrándonos en la posible infección por PCV2 en las granjas, los resultados de la viremia mostraron que ésta es inferior al 15 % en cerdos a final de transición, pero el ADN de PCV2 que se detectó en las manos, ropa y calzado de trabajo sugiere que, al menos en tres de esas granjas (Granjas F, G e I), sí había animales infectados. Una posibilidad es que la infección se limitase a cerdos de transición, y que tuviese una prevalencia inferior al 15 % que nos permitía detectar el muestreo. Otra posibilidad es que existiesen subpoblaciones infectadas en otras fases productivas (Feng *et al.*, 2016). En el caso concreto de la Granja F, éstas podrían ser las cerdas de reposición, como se ha mencionado. No obstante, también es posible que los cerdos infectados fuesen aquellos débiles que se separan del resto para facilitar su recuperación.

La presencia de cerdos infectados en cuadras separadas explicaría por qué casi todas las muestras ambientales de las zonas con cerdos fueron negativas: la toma de muestras no incluyó las cuadras y/o zonas destinadas a enfermería o lazareto. Los cerdos enfermos requieren tratamiento para facilitar su recuperación, siendo indispensable acceder a sus cuadras y tener contacto directo con ellos (Muirhead y Alexander, 2002). Estos animales podrían ser el origen del PCV2 detectado en las muestras de las manos, la ropa y el calzado de trabajo. Ésta fue una limitación del diseño del muestreo ambiental que se detectó *a posteriori*.

Probablemente el hallazgo más sorprendente de este estudio fue la carga de PCV2 que se detectó en las muestras de las oficinas de granjas que vacunan a los lechones. En su conjunto fueron las dependencias donde se detectó PCV2 en un mayor porcentaje de muestras, aunque se observó una variación considerable entre granjas. Esto sugiere que labores que se realizan en las oficinas varían bastante entre granjas. En cualquier caso, parece probable que el PCV2 llegase a través de personas.

Las oficinas se utilizan frecuentemente para las reuniones con las visitas a la granja. Si el visitante no accede a la zona con cerdos, habitualmente la única medida de bioseguridad que utiliza son calzas desechables (Alonso, 2019a). A pesar de que, como se ha comentado previamente, probablemente hay cerdos infectados y que el virus se disemina a través de los operarios de la granja, observando la contaminación de PCV2 en el resto de muestras ambientales no se puede descartar que, al menos en casos puntuales, parte del PCV2 de las oficinas procediese del exterior de la granja.

El paso desde la oficina hacia el resto de dependencias debería hacerse a través de un vestuario, proporcionando la granja ropa y calzado a las visitas. Idealmente, para entrar a las granjas debería ser obligatorio el paso por duchas, medida directamente relacionada con la ausencia de algunas enfermedades (Lambert *et al.*, 2012). Por otro lado, los resultados de este trabajo destacan la necesidad de la L+D en las oficinas y, al igual que sucede con los almacenes, se deben tener en cuenta en los planes de control de enfermedades, pues son una dependencia en la que se relajan las medidas de bioseguridad.

Otro punto importante en el que se detectó PCV2 fueron las áreas de carga de las granjas. Como se ha mencionado, la existencia de subpoblaciones infectadas podría ser el origen del virus, aunque en esta muestra esta hipótesis parece menos probable por el siguiente motivo: en las granjas de producción casi todos los cerdos que pasan por el área de carga son lechones que se envían a cebaderos, y en esta zona sólo están aproximadamente una hora (Berry *et al.*, 2012). En las salas de transición habían estado dos meses y todas las muestras ambientales fueron negativas. Por este motivo parece poco probable que esos lechones contaminen con PCV2 el cargadero en ese breve lapso de tiempo.

La otra posibilidad es que el PCV2 llegase a las áreas de carga a través de los camiones de transporte. Las áreas de carga están en contacto con vehículos de transporte de animales, los cuales suponen un riesgo para propagar enfermedades entre granjas de cerdos (Lowe *et al.*, 2014; Thakur *et al.*, 2017; Giacomini *et al.*, 2018). Los camiones que se utilizan para transportar los lechones desde estas granjas hacia los cebaderos también se usan para llevar cerdos adultos para los mataderos. Como a la edad de sacrificio de los cerdos entre un 20-30% pueden tener viremia de PCV2 (Haake *et al.*, 2014), es probable que contaminen el camión. Además, la L+D habitual de estos vehículos no elimina totalmente el PCV2 (Patterson *et al.*, 2011a) y, en los compartimentos donde se guardan las botas y la ropa que usan durante la carga la L+D probablemente es aún menos eficaz. De este modo, se podría dar la situación de que el camión esté lavado y desinfectado en la zona de los animales, pero el virus permanezca en otras partes.

Se sabe que durante la carga de cerdos se produce una contaminación desde el camión hacia la granja (Ruston *et al.*, 2019). Así, esta tarea conlleva un riesgo para

introducir patógenos en la granja, y es un origen posible y probable del PCV2 que se detectó en los cargaderos de dos de las granjas que vacunaban a los lechones. Los resultados de este trabajo muestran las áreas de carga suponen un riesgo para reintroducir el PCV2, no sólo a través de los cerdos, sino porque en los propios cargaderos puede permanecer el virus. Este es el motivo por el que se recomienda hacer una L+D de las áreas de carga siempre tras su uso y hacia el exterior (Alonso, 2019b). Los resultados de este trabajo justifican este último punto: se demuestra que se pueden detectar virus y en qué cantidad en estos puntos de las granjas.

Finalmente, otro aspecto que se debe comentar fue que en estas granjas que vacunaban a los lechones frente a PCV2 hubo una en la que sólo se detectó ADN del virus en una muestra ambiental: la ropa de calle. En esta granja, por tanto, se puede concluir que no se detectó PCV2 en ninguna de sus superficies, ni de fómites ni operarios. Esto sugiere que en esa granja la infección por PCV2 es muy reducida, o incluso inexistente. Así, este trabajo resultó muy útil para detectar el mayor punto de riesgo para reintroducir el virus en esa granja: a través de la ropa de los operarios. Por tanto, sería interesante mejorar ese aspecto de la bioseguridad externa. De esta forma, esta granja sería idónea para repetir el protocolo de Feng *et al.* (2014) con el objetivo erradicar la infección por PCV2. En base a los resultados que hemos obtenido, tamaño y situación de la granja respecto a la infección por PCV2, podría ser una situación ideal para establecer un plan de erradicación.

3.3.6 Comparación de la contaminación ambiental por PCV2 entre las distintas situaciones sanitarias respecto a la infección

3.3.6.1 Comparación general de los resultados obtenidos

Los resultados del conjunto de granjas con Enfermedad Sistémica por PCV2, Infección subclínica por PCV2 y con vacunación de lechones frente a PCV2 se indican en la Tabla 37.

Tabla 37. Resultados descriptivos de las muestras ambientales en cada situación sanitaria respecto a PCV2.

Estatus PCV2	n pos/n tot. (% pos)	Media*	Desviación Típica*	Rango*
PCV2-SD (1 granja)	26 / 30 (86,67 %)	$3,75 \times 10^6$	$9,38 \times 10^6$	$7,59 \times 10^2$ - $4,07 \times 10^7$
PCV2-SI (4 granjas)	40 / 124 (32,26 %)	$1,73 \times 10^5$	$3,34 \times 10^5$	$2,45 \times 10^2$ - $1,43 \times 10^6$
PCV2-VAC (4 granjas)	21 / 126 (16,67 %)	$1,51 \times 10^6$	$4,88 \times 10^6$	$1,70 \times 10^2$ - $1,95 \times 10^7$

*Expresado como copias de PCV2/hisopo

El ambiente de la granja con PCV2-SD fue el más contaminado con PCV2. La proporción de muestras ambientales en las que se detectó el virus fue estadísticamente mayor en la granja con PCV2-SD que en los otros dos estatus ($p < 0,05$); asimismo, en los casos de PCV2-SI esta proporción también fue significativamente superior que la observada en casos de PCV2-VAC ($p < 0,05$). Además, la cantidad de PCV2 en las muestras ambientales contaminadas fue estadísticamente diferente entre los tres grupos ($p < 0,05$), siendo la mayor en el caso PCV2-SD, seguido de las granjas con PCV2-SI y, finalmente, PCV2-VAC. Mencionar que en casos con PCV2-VAC se detectaron muestras con más de 10^7 copias/hisopo. Estos valores atípicos hacen que el promedio y la desviación típica del número de copias de PCV2 fueran mayores que los observados en casos con PCV2-SI (Tabla 37), a pesar de que estadísticamente el promedio de copias fuese inferior. Los resultados de las comparaciones pareadas y la distribución del número de copias en las muestras contaminadas en cada situación respecto a PCV2 se indican en la Tabla 38 y la Figura 42.

Tabla 38. Comparaciones pareadas entre las tres situaciones respecto a PCV2.

Estatus comparados	Proporción de muestras positivas (Chi cuadrado de Pearson)		Media de copias de PCV2 (Kruskal-Wallis)	
	p-valor ajustado*	ODDS Ratio	H	*p*-valor *
PCV2-SD / PCV2-SI	<0,001	13,650	-24,851	<0,001
PCVD-SD / PCV2-VAC	<0,001	32,258	44,038	<0,001
PCV2-SI / PCV2-VAC	0,012	2,381	19,188	0,016

Estos resultados confirman una hipótesis que se intuía al estudiar la distribución de PCV2: la contaminación por PCV2 en el ambiente de las granjas de porcino depende del estado de la granja respecto a esta infección. Así, en situaciones de PCV2-SD es esperable detectar más muestras contaminadas por PCV2 y con una mayor cantidad de virus que en granjas con PCV2-SI y que en las que estén vacunando a los lechones. Sucederá esto mismo en granjas con PCV2-SI respecto a granjas que vacunan a los lechones.

La mayor contaminación ambiental por PCV2 en situaciones de PCV2-SD se debe a que la proporción de cerdos infectados, la viremia y la excreción vírica son mayores que en casos de infección subclínica y que en situaciones de vacunación (Larochelle *et al.*, 2003; Segalés *et al.*, 2005b; Fort *et al.*, 2008). Esta mayor contaminación en el ambiente probablemente favorece la infección de nuevos animales por vía indirecta, incluso a edades más tempranas, lo que a su vez retroalimenta una mayor presencia de PCV2 en el ambiente.

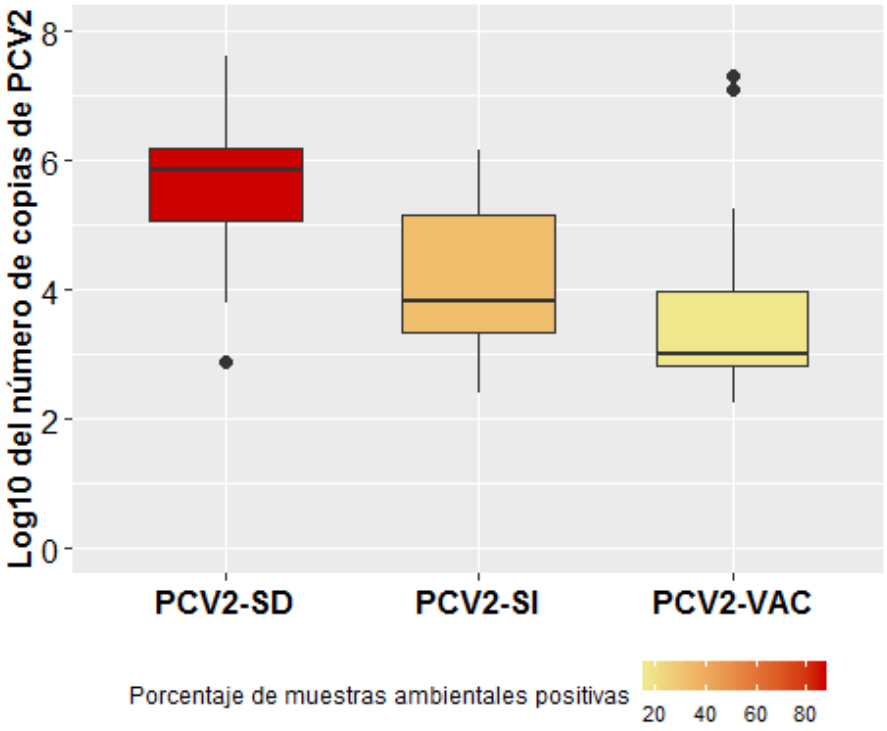


Figura 39. Distribución del número de copias de PCV2 en las muestras positivas en cada situación sanitaria respecto a la infección por PCV2. El color de las cajas representa el porcentaje de muestras ambientales positivas en cada granja.

En situaciones de PCV-SI la excreción de virus y la contaminación ambiental siguen siendo elevadas. No obstante, su menor valor implica que una menor cantidad de PCV2 en el ambiente respecto a la situación con PCV2-SD (Segalés *et al.*, 2005b). Por el contrario, al vacunar a los lechones la viremia y excreción de PCV2 se limita a muy pocos animales (Fort *et al.*, 2009b; Fraile *et al.*, 2012a). Así, se demuestra que en granjas que incluyen a este patógeno en sus protocolos vacunales el PCV2 en el ambiente es mucho menor que en las otras dos situaciones. Además, también se sugiere una L+D de toda la granja para reducir el PCV2 en el ambiente tendría un efecto sinérgico con la vacunación.

3.3.6.2 Comparación de la contaminación ambiental por PCV2 en los distintos tipos de muestras y categorías ambientales.

En la Tabla 39 se muestran los resultados obtenidos para cada tipo de muestra en cada estatus de la infección. Se indica el promedio del número de copias de PCV2 en las muestras contaminadas de cada estatus. La muestra ambiental que se detectó más frecuentemente contaminada con PCV2 fue la ropa de trabajo, positiva en 5 de las 9 granjas que se analizaron. Además, en las tres presentaciones de enfermedad se detectó PCV2 en este tipo de muestra. El caso contrario fueron los comederos de las cerdas en las salas de partos, en los que nunca se detectó PCV2.

Tabla 39. Promedio de copias de PCV2 en cada muestra ambiental en cada situación sanitaria. Entre paréntesis se indican los casos positivos sobre los totales.

		PCV2-SD (1 granja)	PCV-SI (4 granjas)	PCV2-VAC (4 granjas)
Sala de Partos	Comedero de las cerdas	Neg. (0/1)	Neg. (0/4)	Neg. (0/4)
	Jaula de las cerdas	6,31 x10^3 (1/1)	Neg. (0/4)	Neg. (0/4)
	Área de los lechones	7,59 x10^2 (1/1)	Neg. (0/4)	Neg. (0/4)
	Pasillos salas de partos	1,48 x10^6 (1/1)	7,08 x10^4 (1/4)	2,45 x10^2 (1/4)
	Ventiladores de partos	6,46 x10^5 (1/1)	Neg. (0/4)	Neg. (0/4)
	Caja de utensilios	1,66 x10^5 (1/1)	Neg. (0/4)	Neg. (0/3)
Sala de Transición	Tolvas lechones transición	7,59 x10^4 (1/1)	2,21 x10^5 (3/4)	Neg. (0/4)
	Pared corrales transición	1,41 x10^6 (1/1)	3,50 x10^5 (3/4)	Neg. (0/4)
	Suelo corrales transición	4,07 x10^7 (1/1)	1,07 x10^5 (1/4)	Neg. (0/4)
	Pasillos de transición	2,82 x10^7 (1/1)	2,08 x10^5 (3/4)	Neg. (0/4)
	Polvo tabiques transición	8,51 x10^6 (1/1)	5,23 x10^5 (2/4)	Neg. (0/4)
	Ventiladores de transición	3,31 x10^6 (1/1)	1,81 x10^5 (2/4)	Neg. (0/4)
Sala de Gestación	Tolva cerdas de gestación	2,40 x10^4 (1/1)	Neg. (0/4)	Neg. (0/4)
	Suelo corrales de gestación	1,86 x10^5 (1/1)	Neg. (0/4)	2,63 x10^3 (1/4)
	Pasillos de gestación	1,23 x10^6 (1/1)	Neg. (0/4)	1,74 x10^5 (1/4)
Almacén	Suelo del almacén	No muestra	3,59 x10^5 (2/3)	2,98 x10^4 (2/4)
	Mango de utensilios	1,48 x10^6 (1/1)	2,14 x10^3 (2/3)	Neg.(0/4)
	Cazo de alimentación	8,13 x10^5 (1/1)	2,04 x10^3 (2/3)	1,02 x10^3 (1/4)
	Hidrolimpiadora	1,26 x10^6 (1/1)	5,75 x10^3 (1/3)	Neg. (0/3)
	Tableros	3,55 x10^6 (1/1)	1,19 x10^5 (2/4)	Neg. (0/4)
Trabajador	Manos de trabajadores	1,05 x10^5 (1/1)	4,57 x10^3 (1/4)	1,02 x10^3 (1/4)
	Fosas nasales	9,62 x10^3 (1/1)	6,30 x10^3 (2/4)	Neg. (0/4)
	Pelo/Gorro	3,95 x10^4 (1/1)	4,17 x10^3 (2/4)	1,74 x10^2 (1/4)
	Ropa de trabajo	4,87 x10^5 (1/1)	1,18 x10^5 (2/4)	4,76 x10^3 (2/4)
	Botas de trabajo	2,29 x10^6 (1/1)	5,74 x10^5 (3/4)	6,51 x10^6 (3/4)
Oficina	Suelo de la oficina	No muestra	1,74 x10^4 (1/4)	4,01 x10^6 (3/4)
	Pomo de las puertas	3,09 x10^5 (1/1)	3,09 x10^3 (1/4)	1,21 x10^3 (2/4)
	Bolígrafos/Teclado	Neg. (0/1)	1,70 x10^3 (1/4)	7,08 x10^2 (1/4)
	Mesa/sillas	7,24 x10^5 (1/1)	3,46 x10^3 (2/4)	9,12 x10^3 (1/4)
Perímetro	Parking	Neg. (0/1)	2,23 x10^3 (2/4)	Neg. (0/4)
	Entrada principal	3,80 x10^5 (1/1)	3,39 x10^2 (1/4)	4,91 x10^2 (2/4)
	Peldaños de los silos	Neg. (0/1)	Neg. (0/4)	6,46 x10^2 (1/4)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

Todos los tipos de muestras ambientales que estaban contaminados en el caso de PCV2-SD también lo estaban en al menos una de las granjas con PCV2-SI y/o PCV2-VAC. En cambio, las muestras de Bolígrafos/Teclado, del parking y de los peldaños de los silos fueron negativas en el caso de PCV2-SD pero sí estaban contaminadas en al menos uno de los otros dos estatus sanitarios. Esta situación probablemente se deba a la limitación de disponer de sólo un caso con PCV2-SD ya que, observando el grado de contaminación en el resto de muestras, sería esperable que en otras granjas con esa situación sí se detectara PCV2 en esas muestras.

Por otro lado, entre las situaciones con PCV2-SI y con PCV-VAC destacó la diferencia en las muestras correspondientes a las salas de transición y tableros y parking, positivas en al menos la mitad de granjas con PCV2-SI pero siempre negativas en situaciones de PCV2-VAC. En cambio, sólo hubo tres tipos de muestras en los que sí se detectó PCV2 en el caso de PCV2-VAC pero no en PCV2-SI: el suelo de las cuadras y el pasillo de las salas de gestación, y los peldaños de los silos. Asimismo, en las muestras del suelo de la oficina, los pomos de puertas y la entrada principal se encontró PCV2 en más granjas con PCV2-VAC que con PCV2-SI.

En cuanto a la cantidad de PCV2 en las muestras contaminadas se observó el siguiente patrón: la mayor cantidad está en las muestras del caso con PCV2-SD, seguida por las situaciones de PCV2-SI y en PCV2-VAC siempre se detectaron menos copias. Las únicas excepciones fueron las tolvas de los lechones de transición, con más copias en casos de PCV2-SI que en PCV2-SD, y las botas de trabajo y el suelo de las oficinas, en las cuales se detectaron más copias en la situación PCV2-VAC.

Al estudiar conjuntamente estas muestras según la dependencia de la granja donde se tomaron, se observaron diferencias estadísticamente significativas tanto en la proporción de muestras ambientales contaminadas con PCV2 como en la cantidad de virus en las mismas entre las tres situaciones sanitarias.

La proporción de muestras ambientales contaminadas fue diferente en las categorías Sala de Partos, Sala de Transición, Sala de Gestación, Almacén y Trabajador ($p < 0,05$). En cambio, en Oficina y Perímetro no se observaron diferencias ($p > 0,05$). En cuanto a la cantidad de PCV2 en las muestras contaminadas, ésta fue diferente en Sala de Transición y Almacén ($p < 0,05$). En general, la cantidad de PCV2 siempre tiende a ser mayor en las categorías del caso con PCV2-SD respecto a PCV2-SI, y de éste respecto situaciones de PCV2-VAC. En la Tabla 40 y la Figura 40 se muestran los resultados de las comparaciones pareadas y la distribución del número de copias de PCV2 y la proporción de muestras positivas en cada situación sanitara.

USC
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Tabla 40. Comparaciones pareadas de las categorías entre las tres situaciones sanitarias. Se subrayan las diferencias significativas.

Categoría	Estatus comparados	Proporción de positivos (Test exacto de Fisher)		Media de copias de PCV2 (Kruskal-Wallis)	
		p-valor ajustado	ODDS Ratio	H	*p*-valor
Sala de Partos	PCV2-SD / PCV2-SI	<0,001	115,00	n.c.	n.c.
	PCV2-SD / PCV2-VAC	<0,001	111,00	n.c.	n.c.
	PCV2-SI / PCV2-VAC	1,000	1,045	n.c.	n.c.
Sala de Transición	PCV2-SD / PCV2-SI	0,220	1,72	8,340	0,004
	PCV2-SD / PCV2-VAC	<0,001	-	-	-
	PCV2-SI / PCV2-VAC	<0,001	2,398	-	-
Sala de Gestación	PCV2-SD / PCV2-SI	0,006	-	-	-
	PCV2-SD / PCV2-VAC	0,022	6,000	1,333	0,248
	PCV2-SI / PCV2-VAC	1,000	0,833	-	-
Almacén	PCV2-SD / PCV2-SI	0,282	2,283	-6,500	0,040
	PCV2-SD / PCV2-VAC	0,012	6,333	8,167	0,032
	PCV2-SI / PCV2-VAC	0,396	4,419	1,667	1,000
Trabajador	PCV2-SD / PCV2-SI	0,183	2,000	n.c.	n.c.
	PCV2-SD / PCV2-VAC	0,015	4,000	n.c.	n.c.
	PCV2-SI / PCV2-VAC	0,573	3,003	n.c.	n.c.
Oficina	PCV2-SD / PCV2-SI	1,000	4,400	n.c.	n.c.
	PCV2-SD / PCV2-VAC	1,000	2,570	n.c.	n.c.
	PCV2-SI / PCV2-VAC	1,000	1,711	n.c.	n.c.
Perímetro	PCV2-SD / PCV2-SI	1,000	1,500	n.c.	n.c.
	PCV2-SD / PCV2-VAC	1,000	1,499	n.c.	n.c.
	PCV2-SI / PCV2-VAC	1,000	1,000	n.c.	n.c.

n.c. no se calculó el valor ya a que sólo se disponía de una muestra contaminada en al menos un estatus o porque que el test de Kruskal-Wallis no mostró diferencias significativas.
- No se calculó debido a que todas las muestras eran negativas.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

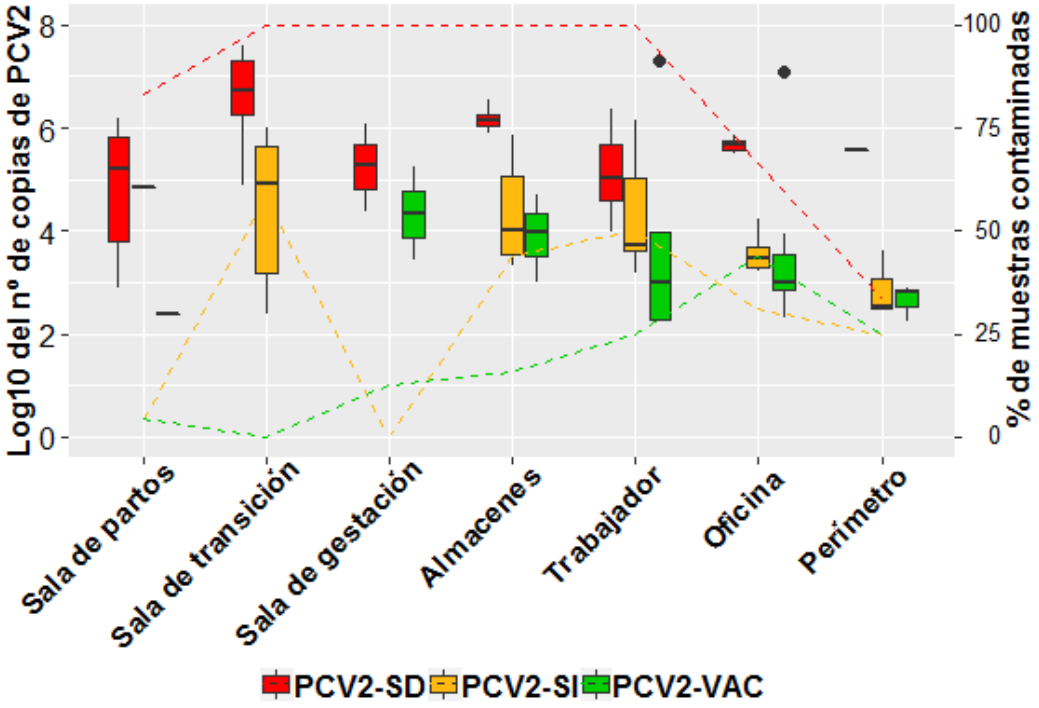
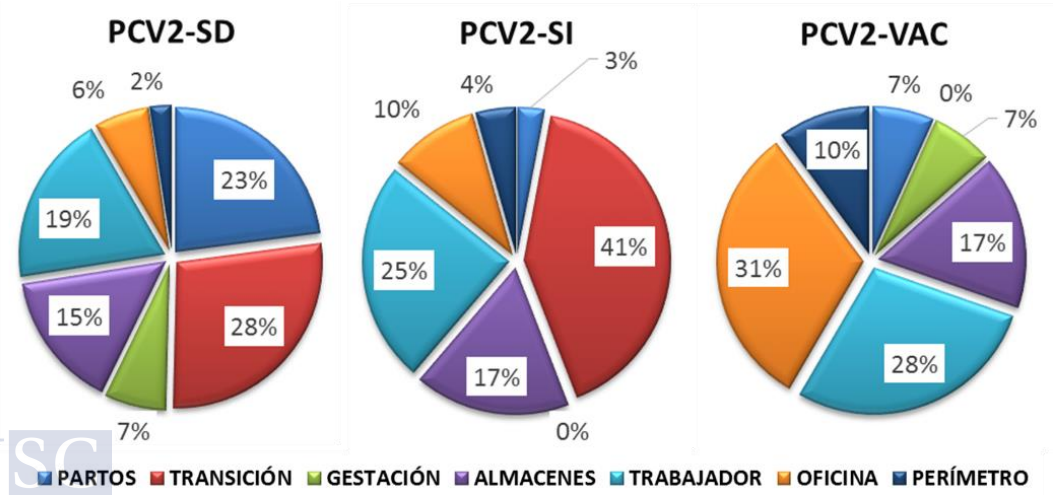


Figura 40. Distribución del logaritmo decimal del número de copias de PCV2 en las muestras positivas de cada categoría en cada estatus sanitario respecto a PCV2. Las líneas discontinuas indican el porcentaje de muestras contaminadas en cada estatus y cada categoría.

Al ponderar cada categoría según el porcentaje que representa cada una sobre el total, y expresar su porcentaje de muestras contaminadas sobre el total de positivos, se confirma que la distribución del virus difiere según sea el estado de la infección por PCV2 en la granja. En la Figura 41 se muestra el porcentaje que representan las muestras positivas de cada categoría ponderada sobre el total de muestras positivas.



USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Figura 41. Porcentaje que representa cada categoría sobre el total de muestras positivas en cada situación sanitaria de la infección.

Por un lado se observa como en una situación de PCV-SD los mayores porcentajes de muestras ambientales contaminadas por PCV2 se corresponden con las Salas de transición y de partos, seguidos por Trabajador y Almacenes, y con menos importancia el resto de categorías. Por otro lado, en casos de PCV2-SI las Salas de transición serán las que más van a repercutir en la contaminación del ambiente, y se incrementa la relevancia de categorías como Trabajador y Oficina. En casos de PCV2-VAC es muy llamativo que la categoría más frecuentemente contaminada es Oficina, seguida por las muestras de Trabajador y Almacén, quedando relegadas las Salas de partos, gestación y transición.

En líneas generales, el nivel de contaminación ambiental por PCV2 tiende a ser mayor cuanto más grave es la situación sanitaria de la infección. Esta afirmación concuerda con lo visto en otras infecciones que afectan a los cerdos, como la causada por *Staphylococcus aureus* meticilina-resistente (Pletinckx *et al.*, 2011). Así, los resultados de este trabajo muestran que en una situación de Enfermedad Sistémica por PCV2 la contaminación del ambiente por el virus es mayor que en casos de infección subclínica y, en ésta a su vez, también superior que en granjas que vacunan a los lechones. Esto está directamente relacionado con el nivel de infección en los cerdos y su excreción (Segalés *et al.*, 2005b; Patterson *et al.*, 2011b).

Probablemente lo más destacable de esta comparación fue que la distribución de PCV2 en el ambiente de la granja fue distinta según la situación sanitaria respecto a la infección. A partir de esta observación se puede afirmar que las principales medidas llevar a cabo para mejorar el control de la infección por PCV2 dependerán de la situación sanitaria a que nos enfrentemos.

En primer lugar, en el caso de la granja con PCV2-SD (siempre teniendo en cuenta la limitación de que únicamente se pudo disponer de una granja con esta situación sanitaria), las principales medidas de control deben actuar sobre los animales alojados en las salas de partos y de transición, así como el ambiente de esas dependencias. La primera medida debe ser implantar una pauta vacunal que proteja a los animales y reduzca la excreción de PCV2. Lo más habitual sería vacunar a los lechones ya que es la pauta vacunal cuyos efectos se obtienen más rápidamente (Segalés, 2015). No obstante, a la vista de estos resultados también parece recomendable implantar al mismo tiempo una vacunación en las cerdas reproductoras.

La toma de muestras en el ambiente de las salas de gestación y de partos (excluyendo los pasillos por ser zona de paso) podría ser útil para detectar casos de transmisión vertical o infecciones tempranas (Shen *et al.*, 2010; Dvorak *et al.*, 2013), pero sobre todo para decidir si es necesario o no vacunar a las cerdas reproductoras. Las muestras de las áreas de descanso de los lechones o las jaulas de las cerdas se

podrían utilizar como herramienta de vigilancia en sospechas de transmisión vertical de PCV2. De hecho, es posible que ofreciesen una información similar a la que ofrecen los líquidos de procesado respecto a la detección de algunos patógenos (Lopez *et al.*, 2018; Vilalta *et al.*, 2018).

Por otro lado, a la vista de estos resultados es innegable que la L+D también tiene un papel básico en granjas con una situación de PCV2-SD. Esta L+D es fundamental en las salas de partos y transición, sobre todo hasta conseguir cierto nivel de inmunidad en los lechones. Otras medidas como la L+D de almacenes, ropa de trabajo… se deben considerar también, aunque en la situación de PCV2-SD tendrán una menor importancia relativa respecto a las mencionadas.

En segundo lugar, en las situaciones de granjas con PCV2-SI y sin vacunación frente al virus, se observó que las áreas más críticas son las salas de transición y por tanto las medidas de control se deben centrar en esa fase. De hecho, estas dependencias son prácticamente las únicas con cerdos en la que se detectó ADN de PCV2. Aunque posible, la transmisión vertical es poco frecuente y los lechones se infectan cuando desaparece la inmunidad maternal (Csank *et al.*, 2013; Eddicks *et al.*, 2016; Dieste-Pérez *et al.*, 2018). Por tanto, resulta esencial reducir la diseminación del PCV2 desde las salas de transición hasta otras dependencias.

La primera medida para evitar esto consiste en vacunar a los lechones frente a PCV2, así se evita su infección y por tanto la excreción de virus (Chae, 2012a). No obstante, puede haber granjas en las que la vacunación no esté justificada ya que no proporcione un retorno económico; es decir, la reducción de la prevalencia y la viremia no proporciona una mejora en la ganancia media diaria de peso y en el índice de conversión de los cerdos (Nielsen *et al.*, 2017). Se trata de casos concretos de granjas libres de algunas de las principales coinfecciones del PCV2 (*M. hyopneumoniae*, *A. pleuropneumoniae* y virus PRRS) (Nielsen *et al.*, 2017), aunque es muy probable que en el futuro se incremente el número de granjas con estas condiciones sanitarias.

Los resultados de este trabajo adquieren una mayor relevancia en estos casos ya que aportan otra perspectiva para el control de la infección. Conocer que las salas de transición y los almacenes son las dependencias de las granjas con PCV2-SI en las que tiende a haber una mayor contaminación con PCV2 permite diseñar una rutina de trabajo que limite la diseminación del virus. Si a esto se suma una buena L+D que elimine el virus de las superficies en que se pueda depositar, especialmente en las salas de transición y en todos los elementos que se utilizan en ella, se conseguiría mantener, y probablemente también mejorar, el estado sanitario de la granja respecto a la infección por PCV2. Sólo se debe recordar que este tipo de medidas de manejo eran en las que se fundamentaban hace ya más de dos décadas las medidas de Madec (Madec *et al.*, 2000).

En tercer lugar, en los casos de granjas que vacunan a los lechones frente a PCV2 la distribución ambiental del virus guarda una similitud con casos de PCV2-SI: a medida que las muestras tienen un contacto menos estrecho con los cerdos, la cantidad de virus en las muestras disminuye gradualmente. Sin embargo, la distribución en el ambiente es diferente. Por ejemplo, el ambiente de las salas de transición parece estar libre de PCV2 y, en cambio, sí se detecta en las salas de gestación. Además se debe destacar otro punto: en los casos de PCV2-VAC y PCV2-SI el porcentaje de muestras ambientales contaminadas con PCV2 en las oficinas fue similar, no obstante, en situaciones de PCV2-VAC fueron las dependencias que representaron mayor porcentaje sobre el total de muestras positivas. Por tanto, en granjas que vacunan a los lechones las medidas para el control del PCV2 pasan, fundamentalmente, por una buena bioseguridad y limpieza.

Por otro lado, como se pudo observar en la Figura 41, se debe destacar que la proporción de muestras ambientales positivas sobre el total que representan los operarios, almacenes y oficinas, y por lo tanto su importancia relativa, tiende a incrementarse a medida que se avanza en el control de la infección. Es decir, para poder avanzar en la mejora sanitaria de las granjas respecto a PCV2, una vez controlada la infección, es indispensable adoptar una buena orden de trabajo y de limpieza en elementos de manejo de animales en las granjas de cerdos. Para esto último es imprescindible lograr involucrar a todos los operarios de la granja en la importancia de las medidas que se establezcan.

Así, los resultados de este estudio muestran que a medida que se mejora el estado sanitario respecto a la infección por PCV2, las medidas de control deben tener en cuenta otros factores, a menudo infravalorados, como el ambiente y dependencias de las granjas. De hecho, hace más de una década ya se mencionó que reducir la carga vírica ambiental sería un factor clave en las futuras estrategias de control de PCV2 (Horlen *et al.*, 2008). Nuestros resultados renuevan y reafirman esa declaración. Actualmente resulta complicado avanzar en control de la infección por PCV2 y pensar en una posible erradicación (Feng *et al.*, 2014). Las observaciones comentadas en este estudio ofrecen nueva información sobre qué puntos adquieren más importancia y se deberían tener en cuenta para conseguir una erradicación en base a un programa vacunal.

El presente estudio de esta tesis reproduce los contenidos de la siguiente publicación:

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

López-Lorenzo, G., Díaz-Cao, J.M., Prieto, A., López-Novo, C., López, C.M., Díaz, P., Rodríguez-Vega, V., Díez-Baños, P., Fernández, G., 2019. Environmental distribution of Porcine Circovirus Type 2 (PCV2) in swine herds with natural infection. Sci Rep 9, 1–8. Editorial Nature Publishing Group (eISSN: 2045-2322). doi:10.1038/s41598-019-51473-6

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

4. ESTUDIO II

Monitorización de la infección por PCV2 utilizando muestras de aire y de superficies

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

4.1 Introducción y Objetivos

La vigilancia es la principal medida para prevenir y controlar las enfermedades infecciosas en granjas de cerdos (Garrido-Mantilla *et al.*, 2019). Confirmar o descartar la presencia de un patógeno puede tener una gran repercusión, tanto sanitaria como económica, para las granjas; de hecho, de ello depende el éxito o el fracaso de los programas de control de enfermedades (Arruda y Gauger, 2019). Cuando pocos animales pueden ser suficientes para mantener endémicamente una infección en una granja, el muestreo para detectar y después aislar o eliminar a esos animales conlleva un gran esfuerzo laboral y económico (Romagosa *et al.*, 2012). Este hecho será incluso más importante en el futuro dada la tendencia del sector porcino a incrementar el número de animales por granja (Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación, 2020).

Con el objetivo de aumentar la eficacia de la toma de muestra en estas situaciones, en los últimos años se han empezado a utilizar nuevas técnicas muestreo que facilitan obtener información de un gran número de cerdos, minimizando el tiempo y el coste económico. Algunas son el uso de cuerdas para la recogida de fluidos orales, los líquidos de procesado, los cordones umbilicales, las muestras de aire o de superficies de las granjas (Prickett *et al.*, 2008; Bangerter *et al.*, 2016; Lopez *et al.*, 2018; Martín-Valls *et al.*, 2018; Vilalta *et al.*, 2019). Todos estas muestras, además de proporcionar información de un gran número de animales, se obtienen mediante técnicas no invasivas que garanten el bienestar animal, característica que las hace idóneas para tener en cuenta en los planes de bienestar animal incluidos en las explotaciones de porcino de España (Real Decreto 306/2020).

Sin embargo, estas técnicas de muestreo también presentan algunas limitaciones. Por ejemplo, el uso de los cordones umbilicales se limita a las primeras horas de vida de los lechones, siendo útiles sólo en animales muy jóvenes o para estudiar transmisiones verticales. El uso de los líquidos de procesado (exudados obtenidos durante los procesos de raboteo, castración…) está limitado a las primeras semanas de vida ya que es el momento en que se realizan dichos procesos. No obstante, su uso es probablemente esporádico debido al objetivo de erradicar el raboteo y la castración física (Ministerio de Agricultura, Pesca, Alimentación y Medio Ambiente, 2017). Los fluidos orales, al igual que las muestras de superficies, suelen representar exclusivamente los cerdos de ciertos corrales (Oliver-Ferrando *et al.*, 2018a). Las muestras de aire presentan una gran variabilidad en cuanto al protocolo de muestreo y el equipo utilizado (Anderson *et al.*, 2017; Stein *et al.*, 2018).

Así, la mayoría de estas técnicas aun requieren de una mejora. De ellas, la más utilizada son las cuerdas para la recogida de fluidos orales. Durante estos años se ha perfeccionado el muestreo de fluidos orales y en la actualidad se dispone de indicaciones como la edad en la que son un método de muestreo más eficiente, el tiempo que deben estar expuestas las cuerdas, su material y el diámetro según la edad del cerdo… (Henao-Diaz *et al.*, 2020). En cambio, para las muestras de aire y de superficies no existe ninguna de estas indicaciones al ser métodos, hasta la fecha, mucho menos utilizados. A pesar de su reciente introducción, estas muestras se han utilizado como herramienta para detectar patógenos, algunos con interés zoonótico, conocer la reducción de la excreción mediante distintas pautas vacunales e incluso para conocer perfiles de resistencia bacteriana (Chapin *et al.*, 2005; Friese *et al.*, 2012; Nantel-Fortier *et al.*, 2016; Neira *et al.*, 2018; Prost *et al.*, 2019; Watt *et al.*, 2020).

La toma de muestras de aire y de superficies es idónea para el PCV2, pues es un virus cuya resistencia facilita su detección (Welch *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2009). Además, la dinámica de esta infección en granjas con infección natural y en las vacunadas permitiría utilizar esta infección como modelo para perfeccionar estas técnicas de muestreo. Hasta la fecha, sólo se conocen tres estudios que hayan detectado este virus utilizando muestras de aire y uno de superficies (Verreault *et al.*, 2010; De Evgrafov *et al.*, 2013; Dvorak *et al.*, 2013; Anderson *et al.*, 2020). Además, todos son trabajos transversales y ninguno relaciona el PCV2 en el ambiente respecto a la infección en la población de cerdos. Esto último es clave ya que conocer esa posible relación podría ser útil para utilizar estas muestras como herramienta de vigilancia y mejorar el control de esta infección.

En base a estos antecedentes, los objetivos planteados en este estudio de esta Tesis Doctoral son los siguientes:

1º Valorar la utilidad del muestreo del aire y de las superficies de las granjas de cebo como herramienta alternativa al muestreo de un número representativo de cerdos para estimar la situación de la infección por PCV2 en la granja.

2º Determinar las superficies y los puntos más adecuados para la toma de muestras de aire con el objetivo de detectar la infección por PCV2 en el conjunto de cerdos durante la fase de cebo.

3º Estudiar el efecto que provoca la vacunación de los cerdos en su nivel de excreción de PCV2 mediante la detección y cuantificación del virus en muestras de aire y de superficies.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.2 Materiales y Métodos

4.2.1 Descripción de las granjas

Se seleccionaron tres explotaciones de cebo con confirmación de la infección por PCV2 y que formaban parte de un régimen de integración con una misma granja de producción.

La granja de producción tenía un censo aproximado de 500 cerdas reproductoras manejadas en bandas semanales; la pauta vacunal de los lechones incluía a *M. hyopneumoniae,* pero no a PCV2. Además, esta granja era PRRS negativa según los criterios de clasificación recomendados por (Holtkamp *et al.*, 2011): negativa a la exposición y excreción del virus (información proporcionada por la veterinaria responsable). Cada dos semanas se enviaban lechones a final de transición desde dicha granja para un cebadero, por lo tanto, cada cebadero incluido en el estudio alojaba aproximadamente dos bandas de producción.

4.2.1.1 Confirmación de la infección por PCV2 en las explotaciones de cebo integradas con la granja de producción

En primer lugar, para confirmar que los cebaderos integrados con la granja de producción estaban afectados por la PCV2-SD, se seleccionaron cuatro cebaderos. La selección de estos cebaderos se realizó según las sospechas de presencia de infección según la veterinaria responsable. Para confirmar la infección en estos cebaderos se visitaron los cuatro cebaderos y se realizaron las siguientes tareas:

- Valoración de signos clínicos compatibles con la infección por PCV2: adelgazamiento progresivo, palidez generalizada de piel, disnea y diarrea.
- Toma de muestras de cerdos muertos o sacrificados: se tomaron muestras de ganglios linfáticos inguinales, bazo y pulmón. Estas muestras se tomaron de acuerdo a lo indicado en el estudio "Distribución ambiental de PCV2 en granjas comerciales de producción de porcino" (Pág. 74).

Por otra parte, en dos de esos cuatro cebaderos se tomaron muestras de sangre de 20 cerdos de forma aleatoria para demostrar la circulación de PCV2. Se consideraron esos dos cebaderos porque alojaban cerdos de aproximadamente 16 semanas de vida, edad que se consideraba la de mayor presencia de signos clínicos en todas las explotaciones de cebo. Las muestras de sangre se tomaron de la vena yugular externa.

Los resultados confirmaron la presencia de PCV2 en los cebaderos de la integradora.

4.2.1.2 Descripción de las explotaciones de cebo incluidas en el estudio

Una vez confirmada la infección en los cebaderos integrados con la granja de producción, se seleccionaron tres cebaderos. El tamaño de estas explotaciones osciló entre 350 y 500 plazas de cebo. El manejo se realizaba mediante el sistema todo dentro – todo fuera: los lechones se recibieron con aproximadamente 9 semanas de edad y permanecieron hasta finalizar la etapa de cebo, en torno a las 25 semanas de vida, para ser enviados al matadero.

Las tres explotaciones de cebo presentaban un diseño similar (Figura 42). Disponían de un pasillo central y cuadras a los laterales en las que se alojaban aproximadamente 15 cerdos, con el suelo parcialmente enrejillado, una sola tolva y un bebedero con alimentación y agua *ad libitum*. La temperatura y la ventilación se regulaban de forma automática mediante el control de la temperatura en el interior y la apertura de ventanas en los laterales. Entre bandas de producción las granjas se limpian, desinfectan y se dejan un mínimo de una semana en vacío sanitario.

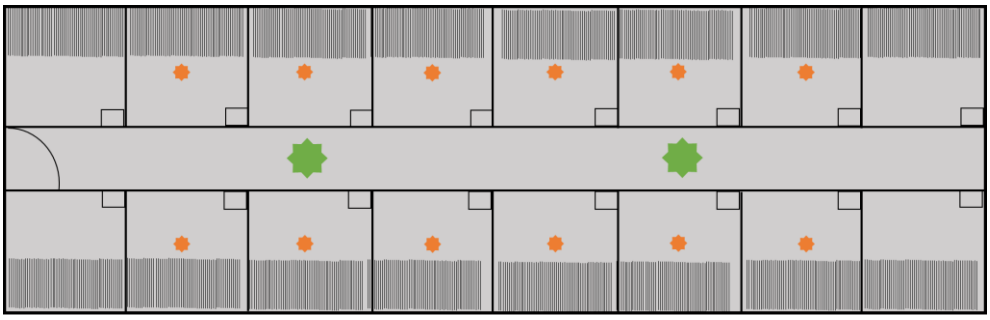


Figura 42. Representación esquemática de los cebaderos incluidos en el estudio. Las estrellas verdes indican los puntos en los que se tomaron las muestras de aire. Las estrellas naranjas representan las cuadras en las que se tomaron las muestras de sangre y de superficies.

4.2.2 Monitorización de la infección por PCV2

4.2.2.1 Diseño del estudio

Dada la situación de infección por PCV2 en todos los cebaderos con cerdos procedentes de la granja de producción, en ésta se decidió vacunar a los lechones frente a PCV2 a las 4 semanas de vida. Aprovechando este cambio, se monitorizaron tres grupos, cada uno en un cebadero:

Grupo A: última banda con todos los cerdos sin vacunar frente a PCV2. Se utilizó como grupo control y en él se incluyeron 360 cerdos.

Grupo B: primera banda con todos los cerdos vacunados frente a PCV2. Se incluyeron 380 cerdos vacunados con Suvaxyn PCV (Ficha técnica Suvaxyn PCV). (Zoetis Belgium S.A., Zaventem, Bélgica).

Grupo C: banda con todos los cerdos vacunados frente a PCV2. Se incluyeron 490 animales vacunados con Ingelvac CircoFlex (Ficha técnica Ingelvac CircoFlex) (Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim am Rhein, Alemania).

Estos tres grupos no fueron consecutivos, sino que entre ambos hubo una banda que no se monitorizó. Esto se hizo para garantizar que todos los cerdos en cada explotación de cebo se habían vacunado con el mismo producto, evitando así el cebadero en el que podrían coincidir cerdos de un grupo y otro (Figura 43).

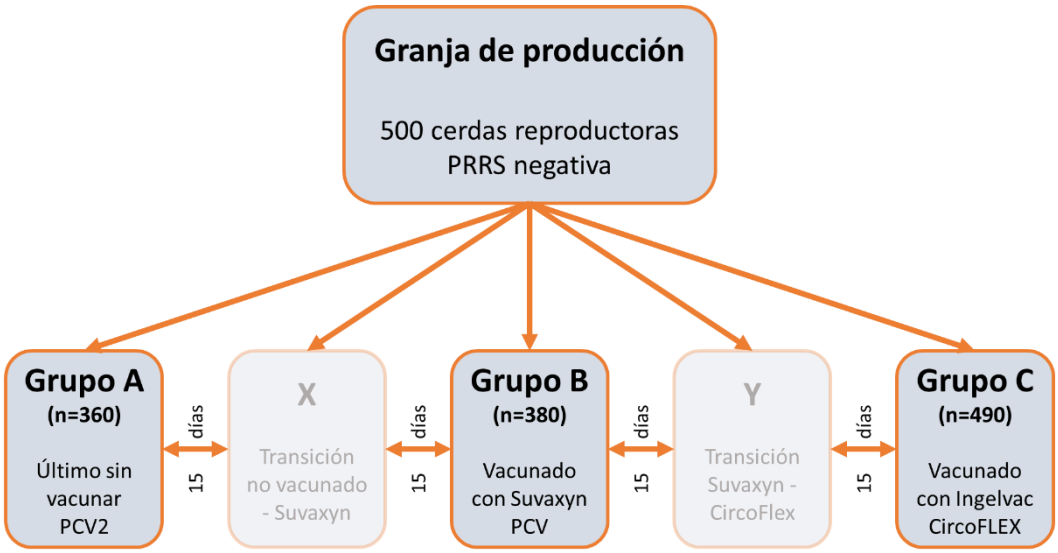


Figura 43. Esquema en el que se representa el origen y el tiempo entre las bandas de cebo incluidas en el estudio.

Cada una de estos grupos se visitó cuando los cerdos tenían 10 semanas de vida (± 3 días), 12 semanas (± 3 días), 14 semanas (± 3 días), 16 semanas (± 3 días) y 18 semanas de edad (± 3 días). En cada visita se tomaron muestras de sangre, del aire del interior del edificio y de distintas superficies.

4.2.2.2 Toma de muestras para monitorizar la viremia de PCV2

Para monitorizar la viremia de PCV2 en las granjas se calculó el tamaño muestral necesario en cada grupo para estimar la prevalencia de infección en cada cebadero, empleando la función *n.for.survey* del paquete epiDisplay del programa estadístico R (Chongsuvivatwong, 2018; R Core Team, 2018). Dado que no se disponía de datos previos de la prevalencia infección de PCV2, se utilizó una prevalencia estimada del 50 %, con una precisión de ± 11,5 % y un nivel de significación del 0,05 %.

El tamaño de muestra necesario para estimar la prevalencia de infección por PCV2 en cada visita y grupo se indica en la Tabla 41. El número de cerdos muestreados fue ligeramente diferente al tamaño de muestra necesario, ya que se decidió tomar

muestras de un número de cerdos múltiplo de cinco para facilitar el análisis laboratorial de las muestras y el posterior análisis de datos. Los animales se seleccionaron de forma aleatoria en cada visita, tomando muestras de cinco cerdos en las cuadras contiguas a los puntos en el que tomaron las muestras de aire (Figura 42).

Tabla 41. Número de cerdos en cada explotación de cebo y número de animales muestreados en cada visita.

Grupo	Tamaño población	Tamaño de muestra necesario	Número de cerdos muestreados
A	360	60	60
B	380	61	60
C	490	63	65

La toma de muestras de sangre se realizó mediante punción de la vena yugular externa de los cerdos empleando tubos estériles con anticoagulante Vacuette® tube 4,5ml K3EDTA (Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Austria). Las muestras obtenidas se conservaron en refrigeración hasta su análisis en laboratorio.

4.2.2.3 Toma de muestras para monitorizar la cantidad de PCV2 en el aire

Para estudiar la presencia de PCV2 en muestras de aire se utilizó el colector MD8 Airport (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Goettingen, Alemania) (Figura 44.A), el cual utiliza la metodología de filtrado para el muestreo del aire (Verreault et al., 2008). Concretamente, en este colector el aire se hace pasar por un filtro estéril de gelatina de un diámetro de 80 mm y 3 µm de poro (17528-80-ACD; Sartorius) (Figura 44.B) en el que quedan atrapados los microorganismos presentes en el aire.



Figura 44. Colector (A) y filtros (B) utilizados para la toma de muestras de aire.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Para garantizar que el muestreo del aire del interior de las explotaciones de cebo fuese lo más representativo posible de todo el edificio, el colector de aire se colocó en el pasillo central en dos puntos situados aproximadamente a 1/3 y 2/3 de la longitud total del edificio (Figura 42). Estos dos puntos se seleccionaron basándose en la metodología

de un trabajo previo que demostró la presencia virus Influenza A en muestras de aire del interior de las granjas mediante esta técnica (Neira *et al.*, 2016).

En cada visita a cada explotación se tomaron seis muestras de aire, cada una utilizando un flujo de aire de 50 L/min durante un tiempo de 30 minutos (1500 L de aire por muestra). El flujo de aire utilizado y el tiempo de muestreo y seleccionados se basaron en bibliografía previa que demostró la presencia en muestras de aire de distintos virus que afectan a los cerdos (Dee *et al.*, 2009; Otake *et al.*, 2010; Corzo *et al.*, 2013a; Alonso *et al.*, 2014; Neira *et al.*, 2016). Los colectores empleados en esos trabajos utilizaban flujos de aire de 200 L/min (Torremorell, M., comunicación personal). No obstante, el colector de aire empleado en este estudio (MD8 Airport) solo permite un flujo máximo de 50 L/min al utilizar los filtros de gelatina. Para solucionar esta limitación se decidió tomar tres muestras de aire en cada uno de los dos puntos de muestreo: a ras de suelo, a la altura de los tabiques (media altura, aproximadamente 1 metro) y a 2 metros de altura.

Una vez realizado el muestreo, cada muestra se guardó en el embalaje individual de cada filtro y todas se mantuvieron a temperatura ambiente hasta su llegada al laboratorio.

4.2.2.4 Toma de muestras para monitorizar la cantidad de PCV2 en las superficies

Las muestras de superficies se tomaron con el método del hisopado descrito en el estudio previo (3.2.2 Toma de muestras ambientales, Pág. 76) y se indican en el Anexo II. En cada visita a cada explotación se tomaron las siguientes muestras de la forma en que se describe:

- Pasillo de la explotación: se colocaron calzas desechables y se dieron 100 pasos. A continuación se pasó el hisopo por la superficie ventral de la calza en zigzag desde la punta hasta al talón y regresando a la punta (Dee *et al.*, 2002).
- Polvo de los tabiques: se pasó el hisopo por la parte superior de los tabiques, en zigzag por aproximadamente 1 m de longitud.
- Tolva: con el mismo hisopo se tomaron muestras de ocho tolvas diferentes (correspondientes a las cuadras donde se habían tomado las muestras de sangre). En cada tolva se delimitó una superficie de 25x25 cm (Espinosa-Gongora *et al.*, 2012) con unas plantillas de material maleable.
- Pared de corrales: en las mismas ocho cuadras que las tolvas y con el mismo protocolo. La superficie se delimitó en la zona limpia del corral, a la altura del hocico de los cerdos (Bangerter *et al.*, 2016).

- Suelo de corrales: en las mismas ocho cuadras que las tolvas y la pared, en la zona sucia de las cuadras. Se utilizó el mismo protocolo que para el pasillo.

Cada hisopo se mantuvo a temperatura ambiente hasta su llegada al laboratorio.

4.2.3 Análisis laboratorial

La determinación de la presencia de PCV2 se realizó mediante qPCR en todas las muestras disponibles (sangre, órganos, aire y ambientales) en el laboratorio de Enfermedades Infecciosas de la Facultad de Veterinaria de Lugo. El análisis histopatológico e inmunohistoquímico de las muestras de órganos se realizó utilizando los servicios de los laboratorios de Anatomía Patológica de la Facultad de Veterinaria de Lugo y de la Universidad Autónoma de Barcelona respectivamente.

4.2.3.1 Muestras de órganos

El análisis de las muestras de bazo, pulmón y ganglios linfáticos inguinales que se tomaron de las bajas se hizo como se indica en el epígrafe 3.2.3.1 Muestras de órganos, Pág. 79. La cantidad de PCV2 se expresó como copias de PCV2/g de órgano (Ecuación 1, Pág. 86).

4.2.3.2 Muestras de sangre

Las muestras de sangre se organizaron aleatoriamente en *pools* de cinco cerdos (Cortey *et al.*, 2011b). En el caso de las muestras de sangre de los cerdos incluidos en la monitorización de la viremia, en cada visita, cada *pool* correspondió a los cinco cerdos de la misma cuadra.

La extracción de ADN de los *pools* de sangre se realizó utilizando el kit High Pure PCR Template Preparation kit siguiendo las instrucciones previamente descritas (Tabla 14, Pág. 82).

La cantidad de PCV2 se en los *pools* de sangre se expresó como copias de PCV2/ml de sangre (Ecuación 2, Pág. 87).

4.2.3.3 Muestras de aire

Las muestras de aire se procesaron en las primeras 24 horas tras llegar al laboratorio. Los pasos fueron los siguientes:

1. Cada filtro se retiró de su embalaje y soporte individual y se transfirió a una bolsa para homogeneizadores de tipo Stomacher®.
2. A cada bolsa se añadieron 5 ml PBT precalentado a 37 ºC.

3. Disolución de los filtros: los filtros de gelatina se disolvieron inicialmente mediante un masaje manual y después mediante homogeneización en Stomacher® durante 1 min.
4. La suspensión se dejó reposar durante 15 minutos a temperatura de 37 ºC.
5. Se transfirió 1 ml de la suspensión a un tubo Eppendorf estéril, que se guardó a -30 ºC hasta la extracción de ADN.

La extracción de ADN a partir de las muestras de aire se hizo siguiendo el mismo esquema de extracción que para las muestras ambientales indicado en Prieto *et al.*, (2017), y descrito en el apartado 3.2.3.3 Muestras ambientales (Pág. 81). La única alteración realizada a este protocolo consistió en el precalentamiento a 37 ºC de las eluciones de los filtros antes de comenzar con la extracción de ADN para facilitar la disolución completa del filtro.

La cantidad de PCV2 en las muestras de aire se expresó como copias PCV2/m^3 aire. La ecuación utilizada para su cálculo fue la siguiente:

Ecuación 4

$$Copias\ \ PCV2/m^3\ aire = copias\ PCV2/reacción * 20 * 5 * 5 * 0{,}667$$

En donde el valor de *copias PCV2/reacción* se obtiene a partir de la recta de cuantificación obtenida (epígrafe 3.2.3.4.1 Construcción de la recta de cuantificación dfe la qPCR, Pág. 85); se multiplica por 20 para obtener el número de copias presente en el volumen de ADN extraído (100 µL); se multiplica por 5, que es la relación entre el volumen utilizado en la extracción (200 µL) respecto a la elución de 1 ml del filtro; el otro 5 es la relación entre el volumen de elución y los 5 ml en que se disolvió el filtro. Finalmente, el 0,667 es la relación entre 1 m^3 y los 1500 L de aire de los que constaba cada muestra.

4.2.3.4 Muestras de superficies

El procesado y extracción de ADN a partir de las muestras de superficies se hizo como se indica en el epígrafe 3.2.3.3 Muestras ambientales (Pág. 81).

La cantidad de PCV2 en las muestras de superficies se expresó como copias de PCV2/hisopo. (Ecuación 3, Pág. 87).

4.2.3.5 PCR cuantitativa para PCV2

Los ADN extraídos a partir de las muestras de órganos, *pools* de sangre, aire y superficies se analizaron mediante qPCR para detectar y cuantificar la presencia de ADN de PCV2. Este proceso se hizo como se indica en el epígrafe 3.2.3.4 PCR cuantitativa para PCV2 (Pág. 84) del estudio "Distribución ambiental de PCV2 en granjas comerciales de porcino".

4.2.4 Análisis de datos

4.2.4.1 Estimación de la prevalencia de PCV2

Para cada grupo, en cada momento de muestreo se estimó la prevalencia de infección utilizando un enfoque frecuentista a partir de los resultados del análisis de las muestras de sangre en *pools* utilizando el recurso web EpiTools (Sergeant, ESG, 2018). Para esta estimación se utilizó el método descrito por Cowling *et al.*, (1999) (Método 3), que asume un test con una sensibilidad y especificidad perfecta (qPCR) y un tamaño de *pool* fijo (5 cerdos/*pool*). La prevalencia y la varianza se estiman con las siguientes fórmulas:

$$\boldsymbol{p = 1 - (1 - x/m)^{1/k}}$$

$$\boldsymbol{Var(p) = \frac{(x/m) \cdot \left((1 - x/m)\right)^{2/k-1}}{mk^2}}$$

$$\boldsymbol{IC = p \ \pm \frac{\alpha}{2} \cdot SE(p)}$$

En donde cada letra representa lo siguiente:

- p = prevalencia estimada
- Var = varianza
- IC: intervalo de confianza
- k = número de muestras en cada *pool*
- m = número total de *pools*
- x = número de *pools* positivos
- SE = error estándar (raíz cuadrada de la varianza)
- α = alfa (5% por defecto)

4.2.4.2 Análisis estadístico

El análisis estadístico se hizo con el programa R Core Team (2018), considerando como significativos los valores de *p* inferiores a 0,05.

En cada grupo (A, B y C) se calculó la proporción de *pools* de sangre, muestras de aire y muestras de superficies positivas a PCV2 en cada muestreo. Asimismo, para cada grupo y muestreo, se calculó el promedio de copias de PCV2 en los *pools* de sangre, muestras de aire y muestras de superficies; se consideraron 0 copias de PCV2 para las muestras con resultado negativo.

Para comparar la viremia de PCV2, la cantidad de PCV2 en aire y en superficies entre los tres grupos y a lo largo del estudio se calculó el Área Bajo la Curva (AUC, por

sus siglas en inglés) entre muestreos consecutivos. El AUC entre cada intervalo de muestreo se calculó utilizando la regla trapezoidal lineal (López-Soria *et al.*, 2014):

$$AUC = \frac{(j - i) * (n_i + n_j)}{2}$$

En donde cada letra representa lo siguiente:

- i = edad cerdos en muestreo 1
- j = edad cerdos en muestreo 2
- n_i = copias de PCV2 en muestreo 1
- n_j= copias de PCV2 en muestreo 2

A continuación, el AUC para cada intervalo de muestreo (10 – 12 semanas, 12 – 14, 14 – 16, 16 – 18) se comparó entre los tres grupos con la prueba de Kruskal-Wallis. Cuando este test mostró la existencia de diferencias significativas, se hicieron comparaciones pareadas mediante el método de Wilcoxon y se ajustaron los *p* valores mediante el método de Holm.

Por otro lado, para estudiar la asociación entre la proporción de muestras positivas de cada tipo (*pools* de sangre, aire y superficies) y la cantidad de PCV2 en las mismas se utilizó la prueba Tau de Kendall. Se utilizó esta prueba después de comprobar la ausencia de normalidad de los datos mediante el test de Shapiro-Wilk.

El estadístico de la Tau de Kendall también se utilizó para estimar la correlación entre la viremia de PCV2 en la población de cerdos con la cantidad de PCV2 en las muestras de aire y de superficies. Esta correlación se estimó a partir del promedio de copias de PCV2 en los *pools* de sangre y del promedio de la cantidad de PCV2 en las muestras de aire y de superficies, respectivamente, en cada edad de toma de muestras y grupo. Este mismo esquema de análisis se utilizó para estudiar la correlación entre la viremia de PCV2 y la cantidad de PCV2 en las muestras de aire tomadas a cada altura y para cada tipo de superficie.

Para comprobar que la significación obtenida en la correlación entre viremia-aire y viremia-superficies no estaba sobreestimada por los datos pareados "0-0" obtenidos en el estudio, se utilizó una modificación de la prueba Tau de Kendall diseñada específicamente para estas situaciones (Pimentel, 2009) (Script en Anexo III). Los resultados de esta Tau de Kendall modificada se utilizaron para comprobar que la significación del estadístico se mantenía y no estaba inflada por la presencia de datos pareados 0-0.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

4.3 Resultados

4.3.1. Rectas de cuantificación de la qPCR de PCV2

Las rectas que se emplearon para cuantificar la cantidad de PCV2 en las muestras con resultado positivo se indican en el estudio "Distribución ambiental de PCV2 en granjas comerciales de porcino", epígrafe 3.3.2 Rectas de cuantificación de la qPCR de PCV2, Pág. 92.

4.3.2 Confirmación de la infección por PCV2 en las bandas previas al estudio

En las cuatro bandas de cebo previas a las incluidas en el estudio se observaron signos clínicos compatibles con una infección por PCV2 (Figura 45): desigualdad en el tamaño de los cerdos observada en la mayor parte de las cuadras, animales con adelgazamiento progresivo, los cerdos en los lazaretos mostraban máculas y pápulas en el tercio posterior.



Figura 45. Signos clínicos compatibles con PCV2 en las bandas de producción previas al estudio. A) Gran Desigualdad de tamaño. B) Se indica la espina dorsal en un cerdo con signos clínicos. C) Cerdos en el lazareto y D) baja, ambos con lesiones compatibles con síndrome de dermatitis y nefropatía porcina. Imágenes cortesía de Silvia García.

Se observaron las preparaciones de Hematoxilina-Eosina de 7 bajas. En las muestras de 5 cerdos se observaron lesiones microscópicas compatibles con una infección por PCV2. En los 5 las lesiones seguían un mismo patrón microscópico; en las Figuras 46, 47, 48, 49, 50 y 51 se muestran las lesiones observadas en el bazo, los ganglios linfáticos inguinales y en el pulmón de dos de esos cinco cerdos.

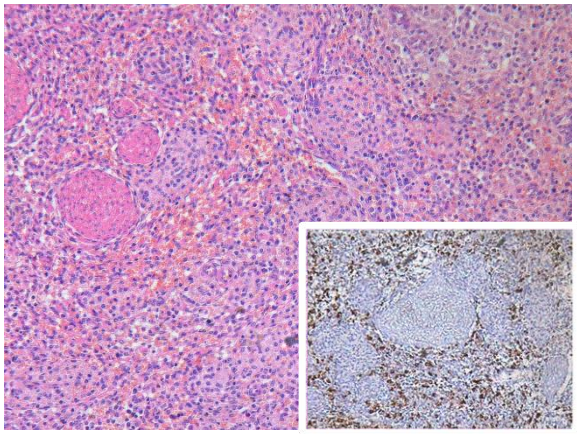


Figura 46. Bazo Cerdo 1. Tinción H-E 10x. Se observa la pérdida de la estructura folicular en la mayor parte del órgano, así como un infiltrado de histiocitos Lesión compatible con una infección por PCV2. La inmunohistoquímica muestra la presencia del virus en el tejido.

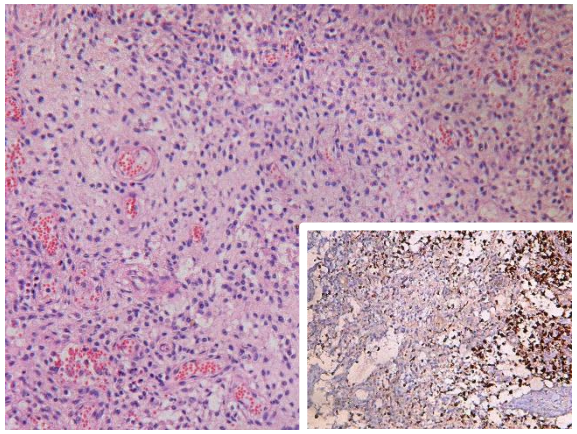


Figura 47. Ganglio linfático inguinal Cerdo 1. Tinción H-E 10x. Depleción linfoide con pérdida de la estructura del órgano. Presencia de un infiltrado granulomatoso. Lesión compatible con una infección por PCV2. La inmunohistoquímica indica la presencia del virus en el tejido.

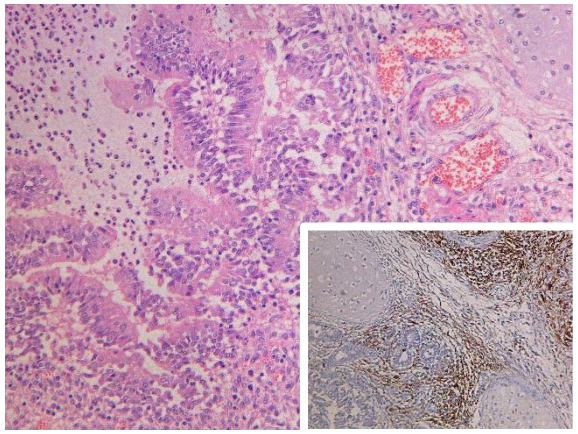


Figura 48. Pulmón Cerdo 1. Tinción H-E 10x. Infiltrado inflamatorio en el tejido pulmonar. Se confirma la presencia de PCV2 en el órgano.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

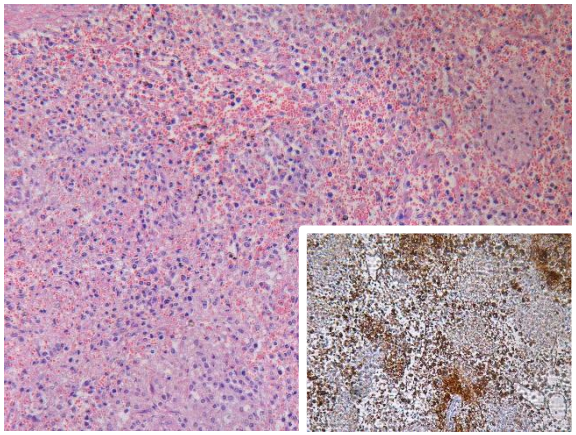


Figura 49. Bazo Cerdo 2. Tinción H-E 10x. Se observa una depleción linfoide y la presencia de un número considerable de células histiocíticas. Lesión compatible con una infección por PCV2. La inmunohistoquímica muestra gran cantidad de PCV2 en el órgano.

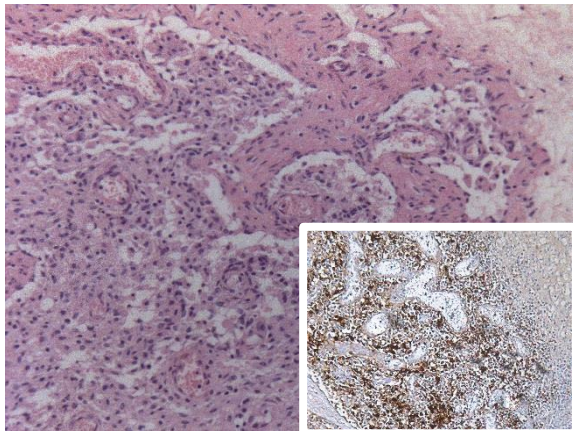


Figura 50. Ganglio linfático inguinal Cerdo 2. Tinción H-E 10x. Pérdida de la estructura folicular del órgano con presencia necrosis en algunas áreas. Ligero infiltrado granulomatoso. Lesión compatible con infección por PCV2. La inmunohistoquímica confirma la presencia de ADN de PCV2 en el órgano.

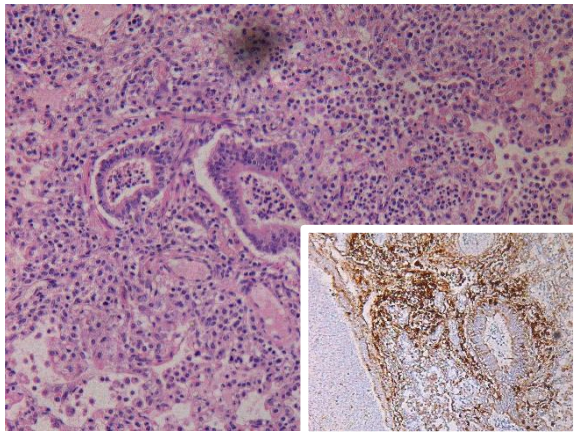


Figura 51. Pulmón Cerdo 2. Tinción H-E 10x. Presencia de gran cantidad de células inflamatorias en el tejido pulmonar. La inmunohistoquímica muestra la presencia de PCV2, localizada principalmente alrededor de las vías respiratorias.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Al mismo tiempo, de esas bajas con lesiones microscópicas compatibles con lesiones debidas a la infección por PCV2 se seleccionaron las muestras de dos cerdos, procedentes cada uno de un cebadero, y se analizaron mediante qPCR de PCV2. Los resultados de la detección de ADN de PCV2 en las mismas se muestran en la Tabla 42:

Tabla 42. Resultados del análisis mediante qPCR de PCV2 en los órganos de las bajas de las bandas de cebo previas a las incluidas en el estudio.

ID	Resultado PCR	Copias PCV2/g órgano
Bazo Cerdo 3	Positivo	$2,48 \times 10^{13}$
Pulmón Cerdo 3	Positivo	$2,51 \times 10^{12}$
Ganglio linf. Inguinal Cerdo 3	Positivo	$1,90 \times 10^{13}$
Bazo Cerdo 4	Positivo	$9,80 \times 10^{11}$
Pulmón Cerdo 4	Positivo	$4,83 \times 10^{12}$
Ganglio linf. Inguinal Cerdo 4	Positivo	$7,21 \times 10^{12}$

Asimismo, en las dos bandas de cebo previas al estudio en las que se había realizado una toma de muestras de sangre, se detectó ADN de PCV2. Todos los *pools* de sangre que se analizaron fueron positivos. Los resultados se muestran en la Tabla 43.

Tabla 43. Resultados del análisis mediante qPCR de PCV2 en las muestras de sangre de cerdos de las bandas de cebo previas a las incluidas en el estudio.

ID*	Resultado PCR	Copias PCV2/ml sangre
Monit. *Pool* 1.1	Positivo	$1,79 \times 10^{7}$
Monit. *Pool* 1.2	Positivo	$9,37 \times 10^{6}$
Monit. *Pool* 1.3	Positivo	$5,81 \times 10^{5}$
Monit. *Pool* 1.4	Positivo	$3,70 \times 10^{5}$
Monit. *Pool* 2.1	Positivo	$3,44 \times 10^{6}$
Monit. *Pool* 2.2	Positivo	$1,39 \times 10^{6}$
Monit. *Pool* 2.3	Positivo	$3,82 \times 10^{4}$
Monit. *Pool* 2.4	Positivo	$5,06 \times 10^{2}$
*Todos los cerdos analizados tenían 16 semanas de edad		

Estos resultados confirmaron la presencia de infección por PCV2 en las bandas de cebo previas a las incluidas en el estudio.

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.3.3 Resultados descriptivos y comparativos de la monitorización de la infección por PCV2 en los grupos vacunados y no vacunados

4.3.3.1 Viremia de PCV2

En el cebadero que incluyó el Grupo A (Control) no se detectó viremia de PCV2 hasta las 12 semanas de vida; en ese momento 11 de los 12 *pools* de sangre fueron positivos y se produjo el pico de infección. En los sucesivos muestreos siempre se detectó viremia de PCV2, aunque su cantidad disminuyó progresivamente (Figura 52). Así, la prevalencia estimada de infección en el grupo control osciló entre un 30,11 y un 100%. En la Tabla 44 se muestran los resultados descriptivos de la viremia de PCV2 en el Grupo A.

En el Grupo B la viremia no se detectó hasta las 14 semanas de edad (Figura 52). En ese momento 1 de los 12 *pools* de sangre de fue positivo. En los muestreos sucesivos se continuó detectando viremia, pero sólo en 1 en *pool* en cada muestreo. Así, desde las 14 a las 18 semanas de vida la prevalencia de infección estimada en el cebadero se mantuvo en un 1,73 % (Tabla 44).

En el Grupo C sólo se detectó viremia a las 18 semanas de edad (Figura 52) y sólo 1 de los 13 pools de sangre resultó positivo. La prevalencia de infección estimada en ese momento fue del 1,59 % (Tabla 44).

Estos resultados muestran que la viremia de PCV2 se detecta más tarde los grupos vacunados. Si se toma el Grupo A (Control) como referencia, el retraso fue de dos y seis semanas en los Grupos B y C respectivamente. Además, a la misma edad de muestreo, el número de *pools* de sangre en los que se detectó PCV2 siempre fue mayor en el Grupo A (Control) que en los grupos vacunados (Tabla 44). Asimismo, el número de copias de PCV2 en los *pools* positivos también fue mayor en los cerdos sin vacunar, con la excepción de los muestreos realizados a las 18 semanas de vida. En ese momento, la cantidad de PCV2 en el *pool* positivo de los Grupos B y C fue mayor que la detectada en 4 y 1 *pools* de sangre del Grupo A.

De este modo, cuando se comparó la viremia entre los tres grupos atendiendo al AUC entre muestreos consecutivos, se observó que este valor fue estadísticamente mayor en el Grupo A respecto a los grupos B y C ($p < 0,001$), entre los cuales nunca se observaron diferencias ($p > 0,05$). En la Tabla 45 se muestran los resultados de las comparaciones pareadas.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

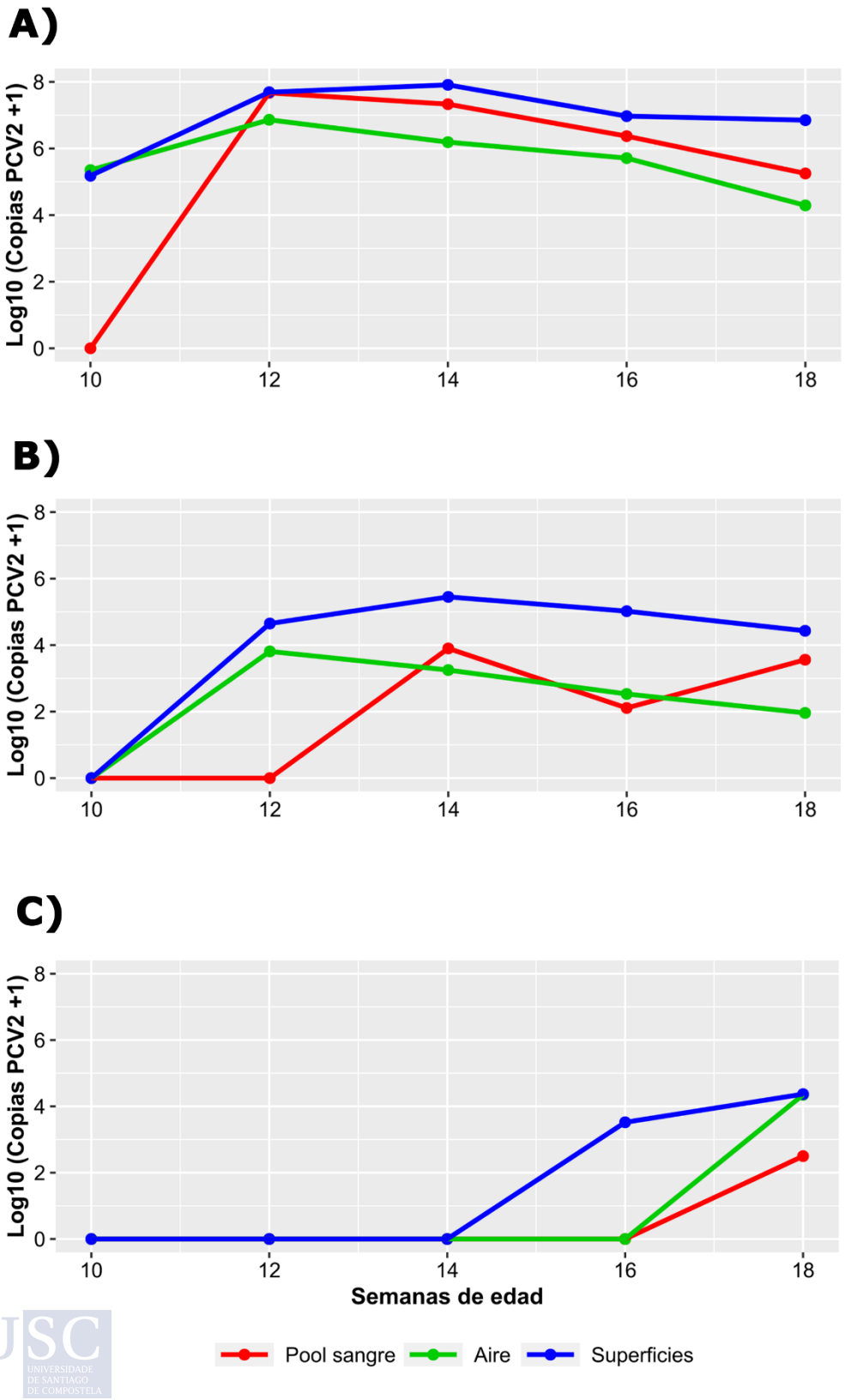


Figura 52. Evolución del Log10 del promedio de copias de PCV2+1 en los Grupos A (Control), B y C. Las copias de PCV2 se expresan por /ml de sangre, /m^3 de aire y /hisopo para los *pools* de sangre, aire y superficies respectivamente. Las muestras negativas se consideraron con 0 copias para ilustrar la evolución en la población (Adaptado de López-Lorenzo *et al.*, 2021, con licencia de John Wiley and Sons).

Tabla 44. Monitorización de la viremia de PCV2 en la población de los Grupos A (Control), B y C (Adaptado de López-Lorenzo *et al.*, 2021, con licencia de John Wiley and Sons).

Grupo	Semanas de vida	10	12	14	16	18
A (Control)	nº *pool* + / nº tot. *pool*	0 / 12	11 / 12	12 / 12	12 / 12	10 / 12
	Prevalencia estimada (int. conf 95%)	0 % (n.c.)	39,16 % (17,3 - 70,84)	100 % (n.c.)	100 % (n.c.)	30,11 % (13,50 - 53,88%)
	Promedio*	0	$4,71 \times 10^7$	$2,15 \times 10^7$	$2,33 \times 10^6$	$1,78 \times 10^5$
	Desviación típica*	-	$6,88 \times 10^7$	$2,54 \times 10^7$	$1,82 \times 10^6$	$2,91 \times 10^5$
	Rango*	-	0 - $2,34 \times 10^8$	$1,83 \times 10^5$ - $9,55 \times 10^7$	$4,78 \times 10^5$ - $6,98 \times 10^6$	0 - $8,06 \times 10^5$
B	nº *pool* + / nº tot. *pool*	0 / 12	0 / 12	1 / 12	1 / 12	1 / 12
	Prevalencia estimada (int. conf 95%)	0 % (n.c.)	0 % (n.c.)	1,73% (0,00 - 9,26%)	1,73% (0.00 - 9,26%)	1,73% (0.00 - 9,26%)
	Promedio*	0	0	$7,91 \times 10^3$	$1,28 \times 10^2$	$3,63 \times 10^3$
	Desviación típica*	-	-	$2,74 \times 10^4$	$4,45 \times 10^2$	$1,26 \times 10^4$
	Rango*	-	-	0 - $9,49 \times 10^4$	0 - $1,54 \times 10^3$	0 - $4,36 \times 10^4$
C	nº *pool* + / nº tot. *pool*	0 / 13	0 / 13	0 / 13	0 / 13	1 / 13
	Prevalencia estimada (int. conf 95%)	0 % (n.c.)	0 % (n.c.)	0 % (n.c.)	0 % (n.c.)	1,59% (0,00 - 8,55%)
	Promedio*	0	0	0	0	$3,16 \times 10^2$
	Desviación típica*	-	-	-	-	$1,14 \times 10^3$
	Rango*	-	-	-	-	0 - $4,11 \times 10^3$

*Expresado como copias PCV2/ml sangre. Los resultados negativos computaron como 0 copias para calcular el promedio y la desviación típica.
n.c. indica no calculado

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 45. Comparaciones pareadas entre los tres grupos del AUC de la viremia, PCV2 en aire y PCV2 en superficies para cada intervalo entre muestreos consecutivos. Se subrayan las comparaciones significativas.

Grupos comparados (i/j)	Intervalos (semanas de vida)	Viremia		Aire		Superficies	
		W	*p*-valor ajustado	W	*p*-valor ajustado	W	*p*-valor ajustado
A / B	10 - 12	138	<0,001	36	0,009	25	0,022
	12 - 14	144	<0,001	36	0,006	25	0,022
	14 - 16	144	<0,001	36	0,010	25	0,024
	16 - 18	144	<0,001	36	0,013	24	0,033
A / C	10 - 12	149,5	<0,001	36	0,008	25	0,022
	12 - 14	149,5	<0,001	36	0,006	25	0,022
	14 - 16	156	<0,001	36	0,008	25	0,024
	16 - 18	156	<0,001	31	0,088	25	0,033
B / C	10 - 12	n.d.	n.d.	27	0,074	17,5	0,424
	12 - 14	84,5	0,336	33	0,010	25	0,025
	14 - 16	91	0,149	30	0,028	20,5	0,106
	16 - 18	85	0,531	12	0,326	16,5	0,451

n.d. No se calculó porque todos los valores mostraban el mismo valor (0).

4.3.3.2 PCV2 en aire

En el Grupo A (Control) se detectó ADN de PCV2 en las muestras de aire de un muestreo previo a la detección de viremia. A las 10 semanas de vida, una de las seis muestras de aire ya fue positiva. En las siguientes visitas siempre se detectó PCV2 en estas muestras (Tabla 46). El pico de PCV2 en el aire de la granja correspondió con las 12 semanas de edad de los cerdos y, al igual que sucedió con la viremia, la cantidad de virus en el aire descendió gradualmente a partir de ese momento (Figura 52)

En el Grupo B también se detectó ADN de PCV2 en el aire antes que la viremia: a las 12 semanas de vida 3 de las 6 muestras de aire resultaron positivas a PCV2, correspondiéndose además ese muestreo con el de mayor cantidad de PCV2 en aire (Tabla 46). En las visitas sucesivas siempre se detectó PCV2 en al menos una muestra de aire, aunque la cantidad fue descendiendo gradualmente (Figura 52).

En cambio, en el Grupo C no se observó este patrón. En este caso la detección de PCV2 en las muestras de aire no sucedió hasta la toma de muestras correspondiente a las 18 semanas de vida, coincidiendo con la detección de viremia (Figura 52). En esa edad 3 de las 6 muestras de aire resultaron positivas. Las tres muestras positivas se correspondieron al mismo punto de muestreo, una a cada altura (Tabla 46).

Estos resultados sugieren que la vacunación también retrasó la edad a la que se detectó PCV2 en las muestras de aire. Tomando como referencia el Grupo A (Control), este retraso fue de dos y ocho semanas en los grupos B y C, respectivamente. Además,

a la misma edad de muestreo, siempre se detectó PCV2 en más muestras de aire del Grupo A (Control) que de ambos grupos vacunados. Asimismo, las muestras con mayor cantidad de virus se correspondieron con el Grupo A (Control), exceptuando el muestreo de las 18 semanas de vida, cuando se detectaron en el Grupo C (Tabla 53).

Así, el AUC de la cantidad de PCV2 en el aire fue mayor en todos los intervalos entre muestreos en el Grupo A (Control) respecto a los valores obtenidos en los grupos B y C ($p < 0,05$), exceptuando en el Grupo C el intervalo 16-18 semanas ($p = 0,088$). Los resultados de las comparaciones pareadas se indican en la Tabla 45.

4.3.3.3 PCV2 en superficies

En el Grupo A (Control) también se detectó ADN de PCV2 en las muestras de superficies antes de detectar la viremia en los cerdos. Concretamente, en el muestreo de las 10 semanas de vida, 2 de las 5 muestras de superficies fueron positivas: el pasillo y el suelo de las cuadras (Tabla 47). En las siguientes tomas de muestras siempre se detectó ADN de PCV2 en todas las muestras de superficies. La mayor cantidad se detectó a las 14 semanas de vida (Figura 52), y después descendió gradualmente aunque en menor medida que la viremia y que la carga de PCV2 en aire.

En el Grupo B también se detectó ADN de PCV2 en las superficies antes que la viremia en los cerdos. A las 12 semanas de vida la muestra del pasillo de la explotación fue positiva. En las siguientes visitas siempre se detectó PCV2 en muestras de alguna superficie, especialmente a las 14 y 16 semanas, cuando 4 de las 5 muestras de superficies fueron positivas (Tabla 47). En la última visita la cantidad de PCV2 en las superficies fue ligeramente inferior a lo observado en las visitas previas (Figura 52).

En el Grupo C, el PCV2 también se detectó antes en las muestras de superficies que la viremia: en el muestreo de las 16 semanas de vida las muestras del pasillo y de las tolvas fueron positivas. En la última toma de muestras se siguió detectando ADN de PCV2 en las superficies, aunque sólo en la muestra del pasillo (Tabla 54).

Así, respecto al Grupo A (Control), la vacunación retrasó la detección de PCV2 en las superficies (dos y seis semanas en los Grupos B y C respectivamente). En las muestras de superficies se repitió el patrón observado en la viremia y en las muestras de aire: a la misma edad de muestreo, el PCV2 se detectó en más muestras y en mayor cantidad en el Grupo A (Control) que en ambos grupos vacunados (Tabla 47).

El AUC de la cantidad de PCV2 en las superficies siempre fue estadísticamente superior en el Grupo A (Control) respecto a ambos grupos vacunados ($p < 0,05$). Entre los grupos vacunados sólo se observó diferencia significativa entre las 12 y las 14 semanas de vida, cuando el Grupo B mostró un valor estadísticamente superior ($p = 0,025$). La Tabla 45 muestra los resultados de las comparaciones pareadas.

Tabla 46. Monitorización de las copias de PCV2/m³ aire en los Grupos A (Control), B y C (Adaptado de López-Lorenzo *et al.*, 2021, con licencia de John Wiley and Sons).

Grupo	Semanas de vida		10	12	14	16	18
	Altura	Punto					
A (Control)	Ras de suelo	a	0	$9{,}25 \times 10^6$	$1{,}10 \times 10^5$	$2{,}25 \times 10^4$	0
		b	0	$2{,}42 \times 10^7$	$9{,}43 \times 10^5$	$3{,}73 \times 10^5$	$3{,}75 \times 10^4$
	Media altura	a	0	$3{,}98 \times 10^6$	$8{,}38 \times 10^4$	$2{,}33 \times 10^5$	$1{,}19 \times 10^3$
		b	0	$2{,}96 \times 10^6$	$3{,}36 \times 10^6$	$1{,}60 \times 10^6$	$2{,}53 \times 10^4$
	2 metros	a	$1{,}35 \times 10^6$	$1{,}33 \times 10^6$	$5{,}34 \times 10^4$	$3{,}68 \times 10^4$	0
		b	0	$1{,}74 \times 10^6$	$4{,}81 \times 10^6$	$7{,}80 \times 10^5$	$5{,}20 \times 10^4$
	Promedio		$2{,}25 \times 10^5$	$7{,}24 \times 10^6$	$1{,}56 \times 10^6$	$5{,}08 \times 10^5$	$1{,}93 \times 10^4$
	Desv. típica		$5{,}52 \times 10^5$	$8{,}78 \times 10^6$	$2{,}03 \times 10^6$	$6{,}04 \times 10^5$	$2{,}24 \times 10^4$
B	Ras de suelo	a	0	$1{,}19 \times 10^4$	0	0	0
		b	0	0	$6{,}13 \times 10^2$	0	$5{,}39 \times 10^2$
	Media altura	a	0	$2{,}63 \times 10^4$	$6{,}28 \times 10^3$	$2{,}04 \times 10^3$	0
		b	0	0	0	0	0
	2 metros	a	0	0	$1{,}96 \times 10^3$	0	0
		b	0	$5{,}70 \times 10^2$	$1{,}81 \times 10^3$	0	0
	Promedio		0	$6{,}46 \times 10^3$	$1{,}78 \times 10^3$	$3{,}40 \times 10^2$	$8{,}99 \times 10^1$
	Desv. típica		-	$1{,}08 \times 10^4$	$2{,}37 \times 10^3$	$8{,}33 \times 10^2$	$2{,}20 \times 10^2$
C	Ras de suelo	a	0	0	0	0	0
		b	0	0	0	0	$2{,}55 \times 10^4$
	Media altura	a	0	0	0	0	0
		b	0	0	0	0	$5{,}93 \times 10^4$
	2 metros	a	0	0	0	0	0
		b	0	0	0	0	$5{,}00 \times 10^4$
	Promedio		0	0	0	0	$2{,}25 \times 10^4$
	Desv. típica		-	-	-	-	$2{,}70 \times 10^4$

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 47. Monitorización de las copias de PCV2/hisopo en las superficies de las granjas de los Grupos A (Control), B y C (Adaptado de López-Lorenzo *et al.*, 2021, con licencia de John Wiley and Sons).

Grupo	Semanas de vida	10	12	14	16	18
A (Control)	Pasillo	$7,45 \times 10^5$	$2,03 \times 10^7$	$7,45 \times 10^7$	$3,75 \times 10^7$	$1,17 \times 10^7$
	Tabique	0	$2,05 \times 10^7$	$2,81 \times 10^7$	$7,36 \times 10^5$	$1,14 \times 10^7$
	Tolva	0	$1,94 \times 10^7$	$5,23 \times 10^6$	$5,97 \times 10^5$	$1,35 \times 10^5$
	Pared corral	0	$3,65 \times 10^6$	$4,53 \times 10^7$	$7,96 \times 10^4$	$3,42 \times 10^5$
	Suelo corral	$1,77 \times 10^4$	$1,84 \times 10^8$	$2,57 \times 10^8$	$7,70 \times 10^6$	$1,20 \times 10^7$
	Promedio	$1,53 \times 10^5$	$4,95 \times 10^7$	$8,20 \times 10^7$	$9,32 \times 10^6$	$7,12 \times 10^6$
	Desv. típica	$3,31 \times 10^5$	$7,54 \times 10^7$	$1,10 \times 10^8$	$1,61 \times 10^7$	$6,28 \times 10^6$
B	Pasillo	0	$2,25 \times 10^5$	$1,36 \times 10^6$	$4,08 \times 10^5$	$1,29 \times 10^5$
	Tabique	0	0	0	0	0
	Tolva	0	0	$3,82 \times 10^4$	$1,12 \times 10^5$	$6,04 \times 10^3$
	Pared corral	0	0	$1,38 \times 10^4$	$1,38 \times 10^3$	0
	Suelo corral	0	0	$3,98 \times 10^3$	$5,13 \times 10^3$	0
	Promedio	0	$4,44 \times 10^4$	$2,83 \times 10^5$	$1,05 \times 10^5$	$2,70 \times 10^4$
	Desv. típica	-	$9,94 \times 10^4$	$6,02 \times 10^5$	$1,76 \times 10^5$	$5,71 \times 10^4$
C	Pasillo	0	0	0	$2,55 \times 10^3$	$1,18 \times 10^5$
	Tabique	0	0	0	0	0
	Tolva	0	0	0	$1,39 \times 10^4$	0
	Pared corral	0	0	0	0	0
	Suelo corral	0	0	0	0	0
	Promedio	0	0	0	$3,28 \times 10^3$	$2,36 \times 10^4$
	Desv. típica	-	-	-	$6,02 \times 10^3$	$5,27 \times 10^4$

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.3.3.4 Cantidad PCV2 en las muestras

Al estudiar conjuntamente estas tres explotaciones de cebo, la proporción de muestras positivas y la cantidad de PCV2 en dichas muestras presentaron una correlación positiva que resultó significativa en los tres tipos de muestras: sangre (τ = 0,903; p < 0,001), aire (τ = 0,803; p < 0,001) y superficies (τ = 0,836; p < 0,001). De esta forma, a mayor proporción de muestras positivas, mayor cantidad de PCV2 en ellas.

4.3.4 Correlación entre la viremia y la cantidad de PCV2 en aire y superficies

El promedio de copias de PCV2 en las muestras de aire en cada muestreo presentó una buena correlación con la media de copias en las muestras de sangre (τ = 0,672; p = 0,001) (Figura 53.A). Esta asociación estadísticamente significativa se observó a las tres alturas a las que se colocó el colector de aire. Las muestras de aire tomadas a ras del suelo presentaron una mayor correlación (τ = 0,786), seguidas por las muestras de aire correspondientes a la altura de los tabiques (τ = 0,762) y, las muestras recogidas a 2 metros de altura (τ = 0,631) (Tabla 48)

Asimismo, la media de copias de PCV2 en las muestras de superficies también mostró una alta correlación con el promedio de PCV2 en las muestras de sangre (τ = 0,746; p < 0,001) (Figura 53.B). Además, cada superficie también mostró una correlación significativa con la viremia en la población, siendo la muestra de la tolva la que mostró una mayor asociación y la del suelo de las cuadras la que menos (Tabla 48).

En 5/15 y 4/15 pares de datos, se detectaron pares "0-0" para las combinaciones viremia-aire y viremia-superficies, respectivamente. A pesar de esta presencia de ceros la significación estadística de las correlaciones también se encontraron al emplear la modificación de la prueba tau de Kendall para controlar el exceso de ceros (Tabla 48). Esto confirma que la presencia de muestras negativas no ha influido en la asociación detectada.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

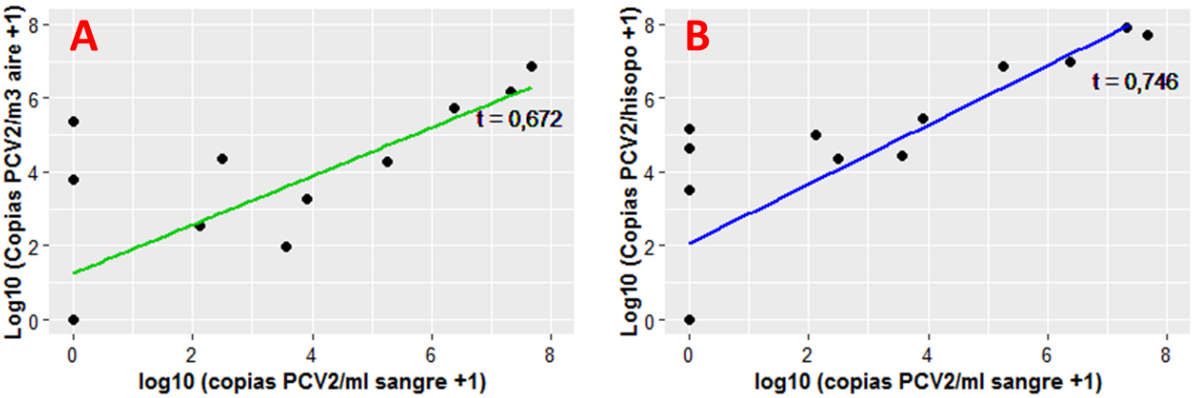


Figura 53. Correlación entre la viremia de PCV2 en la población y la cantidad de PCV2 en aire (A) y en superficies (B).

Tabla 48. Correlaciones entre el promedio de la viremia de PCV2 y el promedio de PCV2 en las muestras de aire y de superficies.

Muestras correlacionadas	Prueba tau de Kendall		Prueba tau de Kendall modificada*	
	τ^1	*p*	$\tau_m{}^1$	*p*
Viremia - Aire (general)	**0,672**	**0,001**	0,559	<0,001
Viremia - aire ras del suelo	**0,786**	**<0,001**	0,541	<0,001
Viremia - aire media altura	**0,762**	**<0,001**	0,561	<0,001
Viremia - aire 2 metros altura	**0,631**	**0,003**	0,370	0,014
Viremia - Superficies (todas)	**0,746**	**<0,001**	0,508	<0,001
Viremia - pasillo	**0,724**	**<0,001**	0,488	<0,001
Viremia - polvo tabiques	**0,710**	**0,002**	0,272	0,005
Viremia - tolva	**0,810**	**<0,001**	0,541	<0,001
Viremia - pared cuadra	**0,801**	**<0,001**	0,491	<0,001
Viremia - suelo cuadra	**0,659**	**0,002**	0,398	0,002

*Utilizada para confirmar que el gran número de ceros en los datos no afectaba a la significación de la prueba tau de Kendall.
[1] Valores de correlación (min: 0; máx: 1).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.4 Discusión

En este trabajo se demuestra que el uso de las muestras de aire y de superficies es capaz de detectar ADN de PCV2 no solamente al mismo tiempo que la viremia en un número representativo de cerdos, sino que puede permitir detectar la infección en una población de cerdos de forma más temprana que la toma de muestras de sangre de un número representativo de animales y su posterior análisis mediante *pools*.

El buen comportamiento de las técnicas de muestreo ambiental encontrado en este trabajo es coherente con lo sugerido previamente por Garrido-Mantilla *et al.*, (2019), quienes sugieren un mayor potencial de estos métodos para la vigilancia de infecciones. Los resultados de este trabajo confirman estas observaciones y sugieren un buen potencial en casos de baja prevalencia de infección, situación esperada tras una correcta vacunación frente a PCV2 (Chae, 2012a). Dada lo extendida que está la vacunación (Dvorak *et al.*, 2016), en casos que sea preciso confirmar o descartar la infección por PCV2 se requiere tomar muestras de un número elevado de cerdos, conllevando un gran coste laboral y económico. Así, las técnicas de muestreo utilizadas en este trabajo permitirían agilizar la toma de muestras y disminuir ese coste, posibilitando además detectar la infección por PCV2 de forma precoz. Además, aunque no comprobado en este trabajo, estas muestras se podrían utilizar para testar al mismo tiempo la presencia de otros patógenos.

La buena correlación que se observó entre la cantidad de PCV2 en aire y en las superficies con la viremia en la población, junto a la asociación positiva entre la proporción de muestras contaminadas y la cantidad de virus en ellas, se ha notificado también en otros virus que infectan a los cerdos, como el Influenza A (Neira *et al.*, 2016). Así, los resultados de este trabajo sugieren que el muestreo del aire y de las superficies podría ser útil como herramienta para vigilar el estado de las granjas respecto a la infección por PCV2, bien como complemento del muestreo tradicional o incluso como alternativa al mismo. De hecho, otros autores ya habían sugerido que la carga ambiental de PCV2 podría ser un indicador del estado de la infección en la granja (Beach y Meng, 2012).

Así, en este trabajo sugerimos que el aire del interior de las granjas se podría utilizar para monitorizar la infección por PCV2, confirmando o descartando la presencia de cerdos infectados. Para esto último el muestreo del aire parece un método interesante ya que todos los cerdos presentes contribuyen a las muestras excretando PCV2 en aerosoles en caso de estar infectados (Hermann *et al.*, 2008). Esto supone una ventaja respecto a otro tipo de muestras como las cuerdas para la recogida de fluidos

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

orales, las cuales solo aportan información de los cerdos presentes en los corrales en los que se colocan (Oliver-Ferrando et al., 2018a).

Teniendo en cuenta que en varios muestreos sólo se ha detectado PCV2 en un punto donde se colocó el colector de aire, en granjas de hasta 500 cerdos de cebo resulta esencial situar el colector en al menos dos posiciones repartidas a lo largo del edificio. La altura a la que se colocó el colector no pareció estar relacionada con la sensibilidad para detectar PCV2, lo cual es coherente con lo observado con otros patógenos como *Salmonella* spp. y *E. coli* en granjas avícolas y de ganado vacuno (Adell *et al.*, 2014; Sanz *et al.*, 2015). No obstante, parece que la correlación entre la cantidad de PCV2 en las muestras de aire y la viremia es mayor en las muestras a ras de suelo y a 1 m de altura. La mayor proximidad con el aire exhalado por los cerdos podría explicar esta observación. De este modo, estos resultados sugieren que en futuros trabajos bastaría con colocar el colector a estas dos alturas; además en granjas más grandes que las incluidas en este estudio probablemente sería necesario colocar el colector en más puntos para garantizar que el aire represente a toda la población de cerdos. De esta forma, los resultados obtenidos en este trabajo son útiles para continuar perfeccionando el protocolo de muestreo de aire en las granjas de cerdos.

Respecto al muestreo de superficies, la detección de PCV2 en las tolvas en varios muestreos, y la correlación de estas superficies con la viremia, sugieren que las tolvas podrían ser las muestras más útiles como herramienta de vigilancia para el PCV2. Las muestras de la pared y el suelo de los corrales también se podrían utilizar, aunque los resultados obtenidos sugieren que su potencial podría ser menor. Por el contrario, a pesar de que las muestras de los pasillos también ofrecen unos resultados bastante buenos no las consideramos adecuadas como herramientas para la vigilancia de infecciones en estas granjas. Esto se debe a que el pasillo es la zona más utilizada por los operarios y es habitual que éstos trabajen en varias explotaciones de cebo. De este modo, no se puede descartar que el PCV2 detectado en los pasillos proceda de otras granjas y haya sido introducido en las explotaciones a través de las botas los operarios (Otake *et al.*, 2002a; Pitkin *et al.*, 2009a; Kim *et al.*, 2017).

La presencia de PCV2 en superficies de las cuadras y en el aire indica que hay cerdos infectados y excretando virus que pueden pasar desapercibidos en un muestreo utilizado para detectar viremia. En nuestro caso, la no detección del virus en sangre cuando sí fue puesto de manifiesto en las muestras ambientales se debe probablemente a que, o bien los cerdos infectados no se incluyeron en el muestreo aleatorio, o a que aún no tenían viremia. La replicación primaria del PCV2 en órganos como las tonsilas puede ser el motivo de una cierta excreción del virus antes que se desarrolle la viremia (Rosell *et al.*, 1999). Esta excreción explicaría por qué se detectó PCV2 en muestras de aire y de superficies antes que en la viremia en la población.

En el caso del Grupo A (Control) no se detectaron cerdos infectados a las 10 semanas de vida, pero dos semanas después 11 de los 12 *pools* de sangre fueron positivos. La estimación de la prevalencia de infección a las 12 semanas de vida se puede considerar bastante buena teniendo en cuenta que el periodo de incubación de este virus oscila entre 4 y 10 días y que su R_0 es de 5,9 (Andraud *et al.*, 2009a). Como se ha mencionado en el párrafo anterior, a las 10 semanas de vida ya habría algunos cerdos infectados los cuales explicarían esta proporción de infectados tras un crecimiento exponencial durante dos semanas. Cuatro semanas después del pico de infección, la proporción de *pools* de sangre positivos decayó, probablemente debido al de inmunidad frente a PCV2 (Carasova *et al.*, 2007; Fort *et al.*, 2007). En cualquier caso, la infección por PCV2 en los cerdos no vacunados siguió la dinámica habitual de las bandas de cebo previas al inicio del estudio.

Los resultados muestran que la vacunación de los lechones retrasó la edad a la que se detectó la infección por PCV2, redujo el número de cerdos que se infectaron y su viremia. Estos resultados son similares a los obtenidos en estudios previos realizados en condiciones de campo con las mismas vacunas (Fachinger *et al.*, 2008; Kixmöller *et al.*, 2008; Segalés *et al.*, 2009; Lyoo *et al.*, 2011). No obstante, la prevalencia de infección por PCV2 estimada por este trabajo fue menor que en los estudios anteriores. Una probable explicación es que este estudio se hizo, a diferencia de los otros, en una granja libre de virus PRRS. La coinfección con el PRRS se relaciona con el incremento de la viremia de PCV2 y de los signos clínicos asociados (Rovira *et al.*, 2002; Wellenberg *et al.*, 2004). Así, en este trabajo se muestra la eficacia que pueden presentar ambas vacunas en condiciones de campo sin que interfiera la coinfección más habitual del PCV2.

La mayor carga de PCV2 en las muestras de aire y de superficies en el Grupo Control es razonable ya que la cantidad de PCV2 en el ambiente depende principalmente de la viremia y del número de cerdos infectados. De hecho, en este trabajo se han observado cantidades superiores a 10^7 copias/hisopo y 10^6 copias/m^3 de aire, valores coherentes con los descritos por Verreault *et al.*, (2010) y De Evgrafov *et al.*, (2013) en muestreos transversales en 23 explotaciones de cebo sin vacunar de PCV2.

A partir de los resultados de este estudio parece bastante probable que cuando los cerdos se crían en un ambiente contaminado con PCV2 sería muy factible que lo puedan ingerir, por ejemplo al alimentarse en las tolvas. No obstante, en un ambiente contaminado se pueden infectar por otras vías. Por ejemplo, los movimientos de los cerdos favorecen la suspensión en forma de aerosoles de las partículas virales presentes en las superficies, aumentando el riesgo de inhalación del virus (Adell *et al.*, 2014). Así, sumado al PCV2 excretado directamente en aerosoles, un cerdo que respire

un volumen de 20 m^3 de aire al día estaría inhalando diariamente hasta 10^8 copias de PCV2 en una banda sin vacunar (Verreault *et al.*, 2010).

Tradicionalmente la eficacia de las vacunas para controlar la infección por PCV2 se ha evaluado en base a la reducción de los signos clínicos, la mejora de los parámetros productivos y de la respuesta inmunitaria, así como en la reducción de la viremia. Algunos ejemplos son: Kurmann *et al.*, 2011; Martelli *et al.*, 2011; Fraile *et al.*, 2012a, 2012b; Seo *et al.*, 2012; Park *et al.*, 2014, 2016; Jeong *et al.*, 2015. Otra forma de evaluar la eficacia de las vacunas es cuantificar la disminución de la excreción vírica tras su administración (Fort *et al.*, 2008; Gerber *et al.*, 2011; Opriessnig *et al.*, 2011a; Seo *et al.*, 2013). Sin embargo, estos estudios son más limitados, principalmente por lo laborioso de la toma de muestras.

En este trabajo se sugiere una nueva forma de evaluar la eficacia de las vacunas: determinar su capacidad para reducir la excreción de patógenos, cuantificando su presencia en el ambiente. Las técnicas de muestreo que se han utilizado en este trabajo son muy accesibles en condiciones de campo (no se requiere de personal especializado, el tiempo de muestreo es reducido en el caso de las superficies, se puede hacer de forma simultánea a otras tareas en el caso del aire) y además resultan asequibles desde el punto de vista económico si se pretende estudiar poblaciones de animales. Además, no menos importante, es que ambos métodos de muestreo no son invasivos y por tanto idóneos para garantizar el bienestar de los cerdos, un aspecto cada vez más importante para la sociedad (Herranz, 2020).

En el caso concreto de este estudio, se ha visto que, respecto al Grupo Control, ambas vacunas retrasaron la edad a la que se detectó el PCV2 en el ambiente (2 y 6 semanas para los grupos B y C, respectivamente). Utilizando el Grupo A (Control) como referencia, en el Grupo B el promedio de PCV2 fue 10^3 y entre 10^2 y 10^3 veces menor en el aire y en las superficies, respectivamente, desde las 12 a las 18 semanas de vida; en el Grupo C sólo se detectó PCV2 en aire a las 18 semanas de vida, en una cantidad similar, mientras que en las superficies también fue entre 10^2 y 10^3 veces menor entre las 16 y las 18 semanas de vida.

Así, los resultados de este trabajo sugieren que la vacuna utilizada en el Grupo C tiene una mayor eficacia si ésta se mide como su capacidad para reducir la excreción de PCV2. Así, la menor presencia de PCV2 en el ambiente de las granjas con cerdos vacunados no se debe únicamente a la protección conferida por las vacunas, sino también al descenso en la excreción que provocan. Esto se debe a que al existir menos cerdos susceptibles, la proporción que se infecta es menor; a nivel de granja, menos animales infectados implican menor excreción y por tanto menor cantidad de PCV2 en el ambiente, la cual a su vez conlleva una menor exposición al virus y por tanto menor riesgo de infección (Segalés *et al.*, 2005b; Andraud *et al.*, 2008; Brunborg *et al.*, 2010).

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

A mayores de los resultados mostrados en este trabajo, también hay varios aspectos del análisis de las muestras de aire y de superficies que se deben tener en cuenta.

En el caso del muestreo del aire, la cantidad de PCV2 depende de la viremia en la población, pero también de la ventilación de la granja (Ferguson *et al.*, 2016). En las granjas analizadas, la ventilación se controlaba de forma automática dependiendo de la temperatura en su interior. La mayor reducción en la cantidad de PCV2 en aire que en superficies a lo largo del estudio sugiere que la ventilación de la granja se debería considerar cuando se utiliza el aire como muestra. A medida que los cerdos crecen, el calor que producen se incrementa (Brumm, 2019), requiriéndose de una ventilación que tiende a ser mayor conforme avanza la fase de cebo. La mayor ventilación puede provocar que la carga vírica en el aire se reduzca por la renovación del mismo y la salida de aerosoles hacia el exterior de la granja (Corzo *et al.*, 2013a; Zhang *et al.*, 2013). Así, el pico de PCV2 en el aire de la granja se detectó a las 12 semanas de edad en los Grupos A y B, lo cual coincidió aproximadamente con el pico de viremia en el Grupo A pero también con un momento en el que la ventilación es reducida. En esos dos grupos, a medida que los cerdos crecieron el número de muestras de aire en las que se detectó PCV2 y la cantidad disminuyeron, coincidiendo con la reducción de la infección pero también con el incremento de la ventilación en los últimos muestreos. Esto sugiere que la disminución en la carga en el aire puede producirse en una magnitud mayor que la disminución en la viremia.

En las muestras de superficies también se observó esa tendencia decreciente, pero fue mucho menos evidente que en las muestras de aire. Esto parece razonable, ya que la disminución de la carga de PCV2 en las superficies depende principalmente del descenso en la excreción del virus, y no tanto de la ventilación en la granja.

Otro aspecto importante a tener en cuenta es que el análisis mediante qPCR no demuestra que el PCV2 detectado en las muestras de aire y superficies esté viable y por tanto, tenga capacidad infectante. Sin embargo, teniendo en cuenta que en condiciones experimentales se ha transmitido la PCV2-SD a través del aire (Kristensen *et al.*, 2013) y, que los virus presentes en partículas de aerosoles o de polvo mayores de 300 nm, las cuales están presentes en instalaciones con cerdos, mantienen su viabilidad (Taylor *et al.*, 2013; Alonso *et al.*, 2015), parece bastante probable que el PCV2 detectado en las muestras de este estudio mantuviese su capacidad infectante. La viabilidad del virus detectado sería un aspecto interesante para desarrollar en futuros estudios centrados en la detección ambiental de PCV2.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Por otro lado, en el diseño de este estudio nos encontramos con un condicionante que limitó un análisis de datos más amplio: el coste económico. Para reducir este limitante, las muestras de sangre se analizaron en *pools* de cinco cerdos como recomiendan Cortey *et al.*, (2011b); después se precisó utilizar una aproximación

frecuentista para estimar la prevalencia de PCV2 a nivel individual. Como se ha comentado previamente, la aproximación ofrece una estimación que desde el punto de vista epidemiológico se puede considerar válida, pero presenta unos intervalos de confianza muy amplios (casi del 50%) en el caso de cerdos no vacunados. Este hecho impidió elaborar un modelo válido a partir del cual estimar la prevalencia de infección en las granjas según el número de muestras ambientales positivas y la cantidad de PCV2 en dichas muestras. La información aportada por este modelo podría ser útil para estimar el riesgo de exposición de otros cerdos e implementar rápidamente medidas que mitiguen el riesgo de transmisión, de igual modo que se ha sugerido para otros virus como Influenza A (Neira *et al.*, 2016). En cualquier caso, a partir de los resultados de trabajo, la elaboración de ese posible modelo de predicción es una idea para desarrollar en próximos estudios, en los cuales se podrían incluir solamente granjas vacunadas frente a PCV2, puesto que actualmente casi todos los cerdos están vacunados frente a esa infección (Segalés, 2015).

En la monitorización de la viremia de PCV2, los resultados obtenidos en los grupos vacunados sugieren que a partir de las 18 semanas de edad la prevalencia de infección podría incrementarse. Esta hipótesis se fundamenta en trabajos previos que comprobaron como la viremia de PCV2 se mantenía estable o aumentaba desde las 18 hasta las 25 semanas de vida (Haake *et al.*, 2014; Feng *et al.*, 2016). Esta hipótesis no se pudo confirmar por el diseño del estudio. En este trabajo se decidió limitar la monitorización hasta las 18 semanas de edad por dos motivos principales. Primero, entre los objetivos solo se incluyó estudiar la relación de la viremia con la carga viral en las muestras del ambiente. Segundo, incrementar el número de muestreos supone una molestia a los ganaderos y a los animales y, a partir de los datos obtenidos, se comprobó que eran suficientes para completar los objetivos planteados en este estudio.

No obstante, el posible incremento de la viremia de PCV2 a partir de las 18 semanas de vida podría no ser relevante en los cerdos destinados a sacrificio, pero sí tener repercusión en el caso de cerdas de recría para reposición. Estos animales normalmente se vacunan frente a PCV2 cuando son lechones (a las 3-4 semanas de vida). Posteriormente, antes de salir de la granja de recría o a la llegada a la granja de destino es, habitual que se revacunen frente a PCV2 (Segalés, 2015). Si esta revacunación no se hace en el momento adecuado, es posible que se produzcan fallos reproductivos (Oropeza-Moe *et al.*, 2017). De hecho, algunos autores ya han indicado que es necesario revisar los protocolos de vacunación frente a PCV2 en las granjas de recría de reposición y, en ciertos casos, adelantar el momento de esta revacunación para evitar infecciones (Eddicks *et al.*, 2018).

De esta forma, el muestreo del aire y/o de las superficies de las granjas podría ser muy útil en explotaciones de recría de reposición. Al igual que lo observado en los grupos vacunados, permitiría conocer la dinámica de la infección por PCV2 en esos

animales y detectar de forma temprana cuando comienzan a infectarse las cerdas para reposición. Así se podría identificar el momento óptimo para revacunar esos animales, evitando su infección por PCV2 y las posibles alteraciones reproductivas en el futuro. A mayores, sería una garantía para las empresas y ganaderos de esta orientación productiva de que las cerdas salen de sus instalaciones negativas a PCV2 y, por tanto, no supondrían un riesgo para introducir PCV2 en las granjas de destino. Además, al mismo tiempo que en estas granjas de recría de reposición se utilizasen las muestras ambientales para detectar PCV2, se podrían utilizar esas muestras para valorar su utilidad para detectar otros patógenos.

El presente estudio de esta tesis reproduce los contenidos de la siguiente publicación:

López-Lorenzo, G., López-Novo, C., Prieto, A., Díaz, P., Panadero, R., Rodríguez-Vega, V., Morrondo, P., Fernández, G., Díaz-Cao, J.M., 2021. Monitoring of porcine circovirus type 2 infection through air and surface samples in vaccinated and unvaccinated fattening farms. Transbound Emerg Dis 00, 1–10. Editorial: Wiley (eISSN: 1865-1682). doi:10.1111/tbed.14069

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

5. ESTUDIO III:

Evaluación de la contaminación de los Equipos de Protección Individual (EPI) utilizados en las visitas a las explotaciones de porcino utilizando el PCV2 como patógeno problema

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

5.1 Introducción y Objetivos

La entrada de personas a las granjas de cerdos es uno de los pilares que siempre se trata al referirse a la bioseguridad externa de las granjas de cerdos (Alarcón *et al.*, 2021). Se sabe que las personas pueden vehicular en su ropa, en su calzado, e incluso en ellos mismos (manos, piel, pelo) patógenos como el virus del PRRS, de la DEP, Influenza A, *Mycoplasma hyopneumoniae, Brachyspira* spp. o *Lawsonia intracellularis* entre otros (Otake *et al.*, 2002a; Allerson *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2017; Filippitzi *et al.*, 2018). Esto conlleva un riesgo evidente para introducir infecciones en las granjas, percepción que está presente en la gran mayoría de granjas de porcino (Simon-Grifé *et al.*, 2013). De hecho, entre las principales medidas de bioseguridad para evitar la entrada de patógenos, las que incumben a los visitantes son las que se cumplen en la mayoría casos (Casal *et al.*, 2007).

Las principales medidas para disminuir el riesgo de infección por la entrada de visitantes son el lavado de manos y el cambio de ropa y calzado previo a la entrada a las instalaciones de cerdos (Alarcón *et al.*, 2021). No obstante, en condiciones de campo y sobre todo en aquellas explotaciones orientadas al crecimiento y cebo de los cerdos, es frecuente que el cambio de ropa y de calzado se sustituya por el uso de equipos de protección individual (EPI) como buzos y calzas desechables.

A pesar de que en condiciones experimentales el uso de estos elementos desechables parece eficaz para evitar la transmisión de virus como el del PRRS y el de la DEP (Otake *et al.*, 2002a; Kim *et al.*, 2017), no es así con otros como el Influenza A (Allerson *et al.*, 2013). No obstante, no se dispone de información sobre la protección frente a la contaminación por patógenos que aportan los buzos y las calzas desechables en condiciones de campo, donde el daño mecánico y consiguiente desgaste de estos elementos es habitual. Así, su empleo tan generalizado se basa más en un uso "por defecto" que no está soportado por trabajos que muestren su capacidad y limitaciones para prevenir la contaminación de la ropa y del calzado. De este modo, es necesario evaluar si estos EPI desechables proporcionan una protección suficiente frente a la contaminación con los posibles patógenos que pueda haber en las granjas comerciales de porcino.

Las técnicas de muestreo ambiental permiten detectar la contaminación por patógenos en diferentes superficies e identificar los riesgos e importancia de diferentes rutas de transmisión (Prieto *et al.*, 2018). En este sentido, son una herramienta excelente para valorar la contaminación y la protección que confieren los buzos y las

calzas desechables que se utilizan en las visitas rutinarias a las granjas de cerdos. De este modo, el objetivo planteado en este estudio fue el siguiente:

1º Aplicar la detección ambiental de PCV2 para estimar la eficacia de los equipos de protección individual que utilizan de modo convencional los visitantes de las granjas de cebo de porcino y evaluar las medidas de bioseguridad a seguir en las visitas.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.2 Materiales y Métodos

5.2.1 Diseño del estudio

5.2.1.1 Equipo de protección individual (EPI) utilizado

En este estudio participaron seis personas, divididas en dos grupos de tres. Cada grupo vistió una combinación diferente de EPI y a continuación realizó una visita a una granja de porcino de una duración aproximada de una hora, simulando una inspección visual, sin estar en contacto directo con los cerdos.

Un grupo (Grupo EPI Certificado) se utilizó para evaluar la protección de EPI certificados. Cada una de las tres personas vistió un buzo desechable certificado (ST40 / UST40; Biztek® Microporous Coverall Type 6/5, Portwest Ltd, Irlanda) con las certificaciones EN 14126 (barrera contra agentes infecciosos), EN 13982-1 (protección contra partículas sólidas), EN 13034 (protección contra químicos líquidos), EN 1073-2 (protección contra contaminación radiactiva) y EN 1149-5 (propiedades electroestáticas), utilizando en todo momento la capucha. Además, cada persona también utilizó calzas desechables certificadas (C-Bootcovers; Tychem1 C, model POBA, DuPont, EE.UU.), con las certificaciones EN 14126 (barrera contra agentes infecciosos), EN 863 (resistencia a la punción) y DIN EN ISO 13934-1 (resistente a la tracción), que se colocaron por encima de unos cubrezapatos convencionales de polipropileno no certificados. Asimismo, se utilizaron guantes desechables durante toda la visita. La Figura 54.A muestra un modelo de cómo se vistió este grupo.

El otro grupo (Grupo EPI convencional) se utilizó para evaluar la protección de los EPI desechables utilizados durante las visitas rutinarias a las granjas de cerdos. Cada una de las tres personas se colocó un buzo simple de polipropileno (Ymbersa Náyade, S.L., Alicante, España) por encima de otro certificado (descrito en el párrafo anterior), y en ningún caso se colocó la capucha. Para el calzado se utilizaron calzas no certificadas de polipropileno (Bastos Viegas S.A., Penafiel, Portugal) sobre unos cubrezapatos convencionales de polipropileno no certificados. Además, se utilizaron guantes desechables durante toda la visita. La Figura 54.B muestra un modelo de cómo se vistió este grupo.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

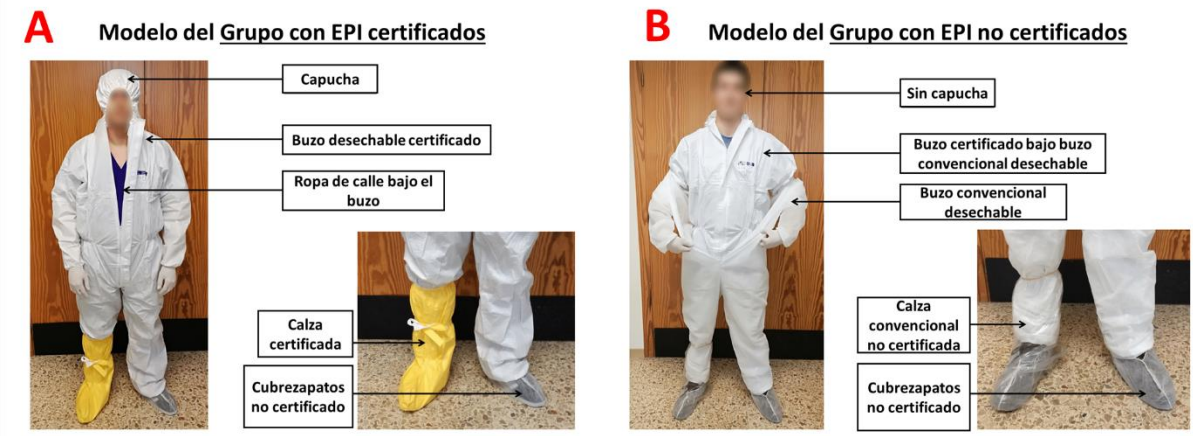


Figura 54. Modelo de la indumentaria vestida por cada miembro de los equipos. A) Modelo del grupo con EPI certificados. B) Modelo del grupo con EPI convencional.

5.2.1.2 Descripción de la visita y de la granja visitada

Se realizó una visita de entre 45 minutos y 1 hora a una explotación comercial de cebo. Durante la misma se hizo simplemente una observación visual del estado de los cerdos, sin estar en contacto directo con ellos en ningún momento.

Dicha granja tenía en el momento de la visita aproximadamente 1200 cerdos. Estaba estructurada en salas completamente separadas; en cada una se alojaban animales correspondientes a bandas de producción semanales de una granja de producción de lechones. Así, en el momento de la visita había cerdos con edades que iban desde las 9 a las 24 semanas de vida, todos sin vacunar frente a PCV2.

En base a seroperfiles previos de la granja, análisis mediante qPCR demostraban que la circulación por PCV2 sucedía entre las 9 y, al menos, entre las 18 semanas de edad, con una seroconversión a nivel de granja entre las 12 y las 15 semanas de edad.

5.2.1.3 Toma de muestras para confirmar la presencia de PCV2 en el ambiente de la granja

Durante la visita a la granja, se tomaron 3 muestras del suelo de corrales con cerdos y otras 3 de la pared de los mismos. Para cada una de estas muestras se pasó un hisopo en zigzag por la superficie correspondiente. Se utilizó un protocolo distinto al utilizado en los otros estudios con el fin de minimizar el contacto de la persona que tomó la muestra con el área de los cerdos.

Tras la visita a la granja, se pasó un hisopo en zigzag por el suelo del parking de la granja antes de tomar las muestras a los EPI, las cuales se tomaron en esta zona.

Esta muestra se tomó para evaluar si esta zona estaba contaminada y, por tanto, pudiera influir en la posible contaminación detectada en los EPI.

Los siete hisopos se conservaron a temperatura ambiente hasta su llegada al laboratorio.

5.2.1.4 Toma de muestras para evaluar la protección de los EPI

Utilizando el método del hisopado (3.3.2 Toma de muestras ambientales, Pág. 76) se tomaron muestras del pelo, la ropa de calle, de los buzos y del calzado antes de entrar a la granja y/o a la salida de la misma. En la Tabla 49 se indica el número de muestras tomadas antes y después de la visita y el protocolo de hisopado para cada una. La toma de muestras realizada antes de entrar a la granja se realizó fuera del perímetro de la misma (entre 1 – 2 km), mientras que la realizada inmediatamente tras la visita se hizo en el parking de la granja. En este último caso, además de revisar la integridad de los EPI, se siguió un orden de toma de muestras en cada grupo:

- Grupo de EPI certificados: pelo, calzas certificadas, cubrezapatos, calzado de calle, buzo certificado y ropa de calle.
- Grupo de EPI convencionales: pelo, calzas convencionales, cubrezapatos, calzado de calle, buzo convencional y buzo certificado.

Tabla 49. Tipo de muestra, protocolo de muestreo y número de muestras incluidas en los grupos de EPI certificados y de EPI convencionales.

Muestra	Protocolo de hisopado	Grupo EPI Certificado		Grupo EPI Convencional	
		Antes de la visita	Después de la visita	Antes de la visita	Después de la visita
Buzo convencional	5 veces cada brazo, pierna y el área del pecho.	-	-	0	3
Buzo certificado		0	3	0	3
Ropa de calle		3	3	0	0
Calzas convencionales	En zigzag toda la superficie de las suelas, desde el talón a la punta (Dee *et al.*, 2002).	-	-	0	3
Calzas certificadas		0	3	-	-
Cubrezapatos		0	3	0	3
Calzado de calle		3	3	3	3
Pelo	10 veces por toda la circunferencia de la cabeza.	3	3	3	3
Total		9	18	6	18

-No usado en ese grupo

Para imitar una situación real, a ninguno de los visitantes se le dio un protocolo a seguir para retirar los EPI. Cada hisopo se conservó a temperatura ambiental hasta su llegada al laboratorio.

5.2.2 Análisis laboratorial

La presencia de PCV2 en todas las muestras se determinó mediante qPCR en el laboratorio de Enfermedades Infecciosas de la Facultad de Veterinaria de Lugo.

El procesado y extracción de ADN a partir de las muestras de las superficies de la granja y de los distintos elementos muestreados en los EPI se hizo como se indica en el apartado 3.2.3.3 Muestras ambientales (Pág. 81). A continuación, los ADN extraídos a partir de las muestras ambientales se analizaron mediante qPCR para detectar y cuantificar la presencia de ADN de PCV2. Este proceso se hizo como se indica en el epígrafe 3.2.3.4 PCR cuantitativa para PCV2 (Pág. 84) del estudio "Distribución ambiental de PCV2 en granjas comerciales de porcino".

La cantidad de PCV2 en las muestras de superficies se expresó como copias de PCV2/hisopo (Ecuación 3, Pág. 87). Para cada tipo de muestra se determinó el número y porcentaje de muestras positivas, así como la media, desviación típica y rango del número de copias cuantificadas por hisopo.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.3 Resultados

5.3.1 Rectas de cuantificación de la qPCR de PCV2

Para cuantificar la cantidad de PCV2 en las muestras con resultado positivo se empleó la recta y = 42,11 – 3,52x indicada en el estudio "Distribución ambiental de PCV2 en granjas comerciales de porcino", epígrafe 3.3.2 Rectas de cuantificación de la qPCR de PCV2, Pág. 92.

5.3.2 Presencia de PCV2 en el ambiente de la granja

Las seis muestras del suelo y la pared de los corrales de los cerdos fueron positivas, indicando la presencia de ADN de PCV2 en el ambiente de la granja. Los resultados se resumen en la Tabla 50.

Tabla 50. Resultados de la presencia de PCV2 en el ambiente de la granja. Se expresa en número de copias de PCV2/hisopo.

Muestra ambiental	nº pos/nº total	Promedio*	Desviación típica*	Rango*
Suelo corrales	3/3	1,22 x10^5	1,39 x10^5	1,76 x10^4 - 2,79 x10^5
Pared corrales	3/3	4,01 x10^4	3,29 x10^4	7,21 x10^3 - 7,31 x10^4

*Expresado como copias de PCV2/hisopo

La muestra tomada en el suelo del parking de la granja fue negativa tras la qPCR de PCV2 utilizando ambos kits de extracción de ADN. Por tanto, se descartó que la posible contaminación por PCV2 de esta superficie alterase los resultados obtenidos en la toma de muestras de los EPI.

5.3.3 Evaluación de la protección de los EPI

No se detectó ADN de PCV2 en ninguna de las muestras de la ropa de calle, el calzado de calle y el pelo tomadas antes de la visita a la granja. Tras la visita, de las 36 muestras que se tomaron en el conjunto de los grupos de EPI Certificados y EPI Convencionales, 20 (55,56 %) fueron positivas. Concretamente, 7 se correspondieron al grupo Certificado (43,75 % de las muestras de ese grupo) y 13 al grupo Convencional (72,22 % de las muestras de ese grupo). En las Tablas 51 y 52 se resumen los resultados obtenidos en cada grupo de EPI.

Tabla 51. Resumen de los resultados de las muestras tomadas en el grupo de EPI Certificados (Adaptado de Díaz-Cao *et al.*, 2018, con licencia CC AL).

Muestra	nº pos/n total	Promedio*	Desviación típica*	Rango*
Buzo convencional	Elemento no muestreado en este grupo			
Buzo certificado	3 / 3	$2,14 \times 10^4$	$2,81 \times 10^3$	$1,96 \times 10^4$ - $2,47 \times 10^4$
Ropa de calle	1 / 3	$1,66 \times 10^3$	-	-
Calzas convencionales	Elemento no muestreado en este grupo			
Calzas certificadas	3 / 3	$1,14 \times 10^5$	$7,84 \times 10^4$	$4,22 \times 10^4$ - $1,97 \times 10^5$
Cubrezapatos	0 / 3	-	-	-
Calzado de calle	0 / 3	-	-	-
Pelo	0 / 3	-	-	-
Total	7 / 18	$5,81 \times 10^4$	$6,93 \times 10^4$	$1,96 \times 10^4$ - $1,97 \times 10^5$

*Expresado como copias de PCV2/hisopo

Tabla 52. Resumen de los resultados de las muestras tomadas en el grupo de EPI Convencional (Adaptado de Díaz-Cao *et al.*, 2018, con licencia CC AL).

Muestra	nº pos /nº total	Promedio*	Desviación típica*	Rango*
Buzo convencional	3 / 3	$4,91 \times 10^3$	$5,29 \times 10^3$	$8,27 \times 10^2$ - $1,09 \times 10^4$
Buzo certificado	1 / 3	$5,77 \times 10^3$	-	-
Ropa de calle	Elemento no muestreado en este grupo			
Calzas convencionales	3 / 3	$2,43 \times 10^4$	$2,36 \times 10^4$	$3,54 \times 10^3$ - $5,00 \times 10^4$
Calzas certificadas	Elemento no muestreado en este grupo			
Cubrezapatos	3 / 3	$3,68 \times 10^4$	$3,60 \times 10^4$	$9,01 \times 10^3$ - $7,75 \times 10^4$
Calzado de calle	2 / 3	$1,50 \times 10^4$	$1,98 \times 10^4$	$2,91 \times 10^4$ - $1,04 \times 10^3$
Pelo	1 / 3	$6,93 \times 10^2$	-	-
Total	13 / 18	$1,80 \times 10^4$	$2,29 \times 10^4$	$8,27 \times 10^2$ - $7,75 \times 10^4$

*Expresado como copias de PCV2/hisopo

Las protecciones más externas del cuerpo y del calzado se contaminaron con PCV2 en todos los casos (6 de 6) tras realizar la visita a la explotación de cebo. Además, la cantidad de copias del virus en dichas protecciones resultó acorde con la cantidad de copias detectada en las superficies de la granja y fue similar entre los dos grupos. No obstante, en las calzas certificadas, generalmente, se detectó un mayor recuento de PCV2 que en las convencionales.

Tanto en el Grupo de EPI Certificados como en el Grupo de EPI Convencional se detectó ADN de PCV2 en las muestras de 1 de los 3 elementos situados inmediatamente tras el buzo en contacto con el ambiente de la granja (la ropa de calle en la primera situación, y el buzo certificado en el segundo caso respectivamente). En cambio, todas las muestras del pelo en el grupo EPI Certificados fueron negativas,

mientras que en un caso en el grupo de EPI Convencional se detectó ADN de PCV2. No se apreciaron signos de rotura en los buzos certificados ni en los convencionales.

En cambio, en los elementos del calzado se observó un comportamiento diferente entre los dos grupos. En el Grupo de EPI Certificados no se detectó ADN de PCV2 en ningún elemento protegido por las calzas certificadas, es decir, todas las muestras de los cubrezapatos y del calzado de calle fueron negativas. Además, en la inspección visual de las calzas certificadas al finalizar la visita no se observaron signos de rotura de las mismas. Por el contrario, en el grupo de EPI Convencionales se detectó ADN de PCV2 en las muestras de los cubrezapatos de los tres visitantes (3 de 3), y en dos de ellos también en el calzado de calle, a pesar de que iban cubiertas por unas calzas convencionales. En la inspección visual de las calzas convencionales, se observó que tras la visita todas presentaban roturas o perforaciones, además, en este grupo todos los cubrezapatos presentaban signos de desgaste.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.4 Discusión

Hasta donde sabemos, este es el primer trabajo en el que se evalúa la contaminación y la protección que confieren los EPI convencionales desechables y otros EPI certificados en condiciones de campo. Conocer la protección real que proporcionan los EPI utilizados en las granjas de cerdos supone un conocimiento fundamental para abordar la bioseguridad de las explotaciones de porcino. De hecho, la bioseguridad constituye uno de los pilares de la estrategia de sanidad animal de la Unión Europea, bajo el lema "prevenir es mejor que curar" (Comisión Europea, 2007). Así la información obtenida en este trabajo se integra perfectamente en la idea de ese lema.

Tradicionalmente, la bioseguridad en las granjas de cerdos siempre ha sido mucho mayor en las granjas de cerdos respecto a otras producciones como el bovino de leche, de carne y el ovino, especialmente en lo referente a las visitas (Nöremark *et al.*, 2010; Sahlström *et al.*, 2014). De hecho, los porcentajes de granjas que obligan a los visitantes a utilizar ropa de la propia granja o EPI oscilan entre el 76 % en las granjas de cebo y el 90 % en las granjas con reproductoras (Simon-Grifé *et al.*, 2013; Backhans *et al.*, 2015).

En general, la cantidad de PCV2 detectada en los EPI externos fue inferior a la detectada en las superficies de la granja. La presencia de PCV2 en partículas en suspensión en el aire de la granja, y el arrastre de la contaminación presente en el ambiente que ocurre al caminar con las calzas contribuye a la contaminación de estos elementos (Verreault *et al.*, 2010). De esta forma, la contaminación de los buzos y las calzas era esperable; además es coherente con la contaminación que detectaron en los EPI otros autores que estudiaban la posible transmisión del virus del PRRS, de la DEP y de Influenza A a través de los cuidadores (Otake *et al.*, 2002a; Pitkin *et al.*, 2009a; Allerson *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2017). No obstante, a diferencia de los trabajos mencionados, en nuestro caso no se entró en ningún momento en contacto directo con los cerdos. Así, en este trabajo se pone de manifiesto que una visita de corta duración a una granja con cerdos infectados por PCV2, aun sin tener contacto con ellos, es suficiente para contaminar todas las partes externas de los buzos y de las calzas.

Respecto a los buzos, tanto en el grupo que utilizó EPI certificados como en el que usó EPI convencionales, en varios casos se detectó ADN de PCV2 en la ropa situada inmediatamente bajo ellos. De este modo, parece que los EPI no son totalmente eficaces para proteger a los visitantes de la contaminación viral de la ropa de calle durante las visitas a las granjas de cerdos. No obstante, se debe valorar de distinta forma la contaminación detectada en la ropa situada bajo los buzos certificados y los buzos no certificados.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

En el grupo que utilizó EPI certificados, teniendo en cuenta que las muestras de la ropa tomadas antes de entrar a la granja fueron negativas a la presencia de PCV2, que los buzos presentaban una certificación contra agentes infecciosos y que al finalizar la visita no mostraban signos de rotura, parece probable que el PCV2 detectado en la ropa de calle tras la visita pudiera deberse a una contaminación durante la retirada de los EPI. Se sabe que en el proceso de retirada de los EPI en ambientes hospitalarios es habitual que se produzca una contaminación de la ropa y de la piel (Tomas *et al.*, 2015). Además, la menor cantidad de PCV2 detectada en la ropa de calle también resulta acorde con esa hipótesis.

En el grupo que utilizó los buzos convencionales también se debe considerar la posibilidad de una contaminación durante su retirada, principalmente porque no presentaban signos de rotura. No obstante, en este caso el buzo convencional carecía de la certificación frente a agentes infecciosos. Por tanto, no se puede descartar que el PCV2 detectado en el buzo situado bajo ellos sea consecuencia de una protección insuficiente. De este modo, no se puede recomendar el uso de los buzos convencionales durante las visitas a las granjas de cerdos.

Los resultados más destacables de este estudio se encontraron en los EPI que protegen el calzado. Los resultados fueron completamente opuestos en el grupo certificado y en el grupo no certificado. Las calzas certificadas no presentaron signos de rotura o desgaste al finalizar la visita; además mostraron una eficacia completa para prevenir la contaminación con PCV2 de los elementos situados bajo ellas en las condiciones de este estudio. En cambio, en el grupo que utilizó las calzas convencionales se detectó ADN de PCV2 en las muestras bajo ellas: todos los cubrezapatos e incluso en dos muestras del calzado de calle. Tras la visita, todas las calzas convencionales estaban rotas o perforadas, lo que explica la presencia de PCV2 en los elementos bajo ellas. Además, en este grupo se observó una cantidad mayor de PCV2 en los cubrezapatos que en las calzas, a pesar de que los primeros estaban protegidos por las segundas. Esto se podría deber a que el PCV2 entra por los agujeros de las calzas, acumulándose en ese espacio y contaminando en mayor medida los elementos protegidos por las calzas convencionales. De esta forma, las calzas rotas no protegen frente a la contaminación viral, sino que tienen un efecto totalmente opuesto.

De esta forma, los resultados de este trabajo muestran la usencia de eficacia de una medida considerada básica en el sector como el uso de calzas desechables para prevenir la contaminación a través del calzado (Alonso, 2019a). Generalmente en las granjas de porcino los suelos resultan abrasivos para las calzas y siempre acaban provocando roturas como las observadas en este estudio. Esto favorece la contaminación del calzado de calle y aumenta el riesgo de diseminar patógenos entre las granjas (Dee *et al.*, 2002; Pitkin *et al.*, 2009a). Además, el uso de estos EPI podría incluso ser contraproducente al proporcionar una falsa sensación de protección a los

usuarios. Así, a partir de los resultados de este trabajo se aconseja reemplazar el uso de calzas desechables por otros elementos como botas de goma, u otro material resistente a la abrasión suelos, propias de la granja y de uso obligatorio para los visitantes, pudiendo ser reutilizadas tras una correcta L+D.

La importancia de una buena bioseguridad en las granjas está en la mentalidad de los ganaderos, no sólo para proteger sus granjas sino también para proteger la próxima a la que va el visitante (Nöremark *et al.*, 2016). En ese sentido, no suele haber inconvenientes en implementar medidas de bioseguridad siempre que su coste extra proporcione un retorno económico (Nöremark *et al.*, 2016). Esto supone una limitación para recomendar el uso de los EPI certificados debido a su coste económico. Por tanto, se propone, como se ha mencionado, el uso de botas de goma y de ropa proporcionada por la granja, junto con un lavado exhaustivo de las manos, antes de entrar a las instalaciones con cerdos.

La ducha previa a la entrada siempre es una medida recomendada, considerándose la más eficaz para prevenir la entrada de infecciones (Lambert *et al.*, 2012). Tras observar los resultados de este trabajo parece que parte de su eficacia radica en que lleva asociada un cambio de la ropa, ropa que como se ha visto puede vehicular patógenos. Así, en granjas donde no exista una ducha, si su orientación productiva es el cebo de cerdos, el lavado de manos junto con el cambio de la ropa y de las botas se podría considerar suficiente como medida de bioseguridad.

No obstante, en las granjas en las que se opte por utilizar EPI para el cuerpo y el calzado se debe indicar cómo utilizarlos. Un aspecto a resaltar del diseño de este estudio fue no se estableció ningún protocolo para retirar los EPI. Esto se hizo para emular la situación que sucede tras la visita a las granjas de cerdos. Los resultados de este trabajo indican que, sin indicaciones y aun utilizando buzos certificados, los patógenos probablemente alcanzarán la ropa de calle. Así, este estudio muestra la necesidad de elaborar y seguir protocolos para la retirada de los EPI y evitar la contaminación accidental de la ropa. Un protocolo a seguir podría ser el siguiente:

1. Retirar las botas.
2. Retirar la capucha sin tocar el pelo ni la parte interior del buzo.
3. Bajar la cremallera del buzo.
4. Sacar los guantes de modo que su parte exterior quede hacia el interior; a continuación lavar las manos.
5. Retirar el buzo evitando tocar con las manos el exterior del mismo.
6. Desechar el buzo en un contenedor adecuado, evitando tocar nuevamente el exterior del buzo.
7. Lavar nuevamente las manos.

Por otro lado, se debe señalar que la qPCR fue una herramienta excelente para alcanzar el objetivo planteados en este estudio. Además, los resultados de este estudio sugieren la necesidad de reevaluar las medidas de bioseguridad llevadas a cabo actualmente en las granjas de porcino. En este trabajo se utilizó como modelo la infección por PCV2 por ser un virus presente en prácticamente todas las explotaciones, con capacidad de permanecer en el ambiente (Segalés *et al.*, 2005a; Martin *et al.*, 2008; O'Dea *et al.*, 2008) y por tanto idóneo para estimar la eficacia que proporcionan los EPI.

Finalmente, mencionar que los resultados de este trabajo sugieren la necesidad de comprobar si los virus presentes en el calzado bajo las calzas desechables o en la ropa mantienen capacidad infectante y serían capaces de transmitir la infección a otras granjas. En este sentido, la qPCR no tiene capacidad para demostrar esta viabilidad (Dewulf *et al.*, 2005), pero se podría cumplimentar con otras técnicas de laboratorio como el cultivo de virus o bien bioensayos. Además, se debe de tener en cuenta el patógeno problema, pues como se ha comentado los resultados pueden ser variar según sean virus que provocan alteraciones digestivas o respiratorias (Allerson *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2017).

El presente estudio de esta Tesis Doctoral reproduce los contenidos de la siguiente publicación:

Díaz-Cao, J.M., Prieto, A., **López, G.**, Fernández-Antonio, R., Díaz, P., López, C., Remesar, S., Díez-Baños, P., Fernández, G., 2018. Molecular assessment of visitor personal protective equipment contamination with the Aleutian mink disease virus and porcine circovirus-2 in mink and porcine farms. PLoS One 13. Editorial: Public Library Science (eISSN: 1932-6203). doi:https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203144

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

6. CONCLUSIONES

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

A partir de los resultados obtenidos en los diferentes estudios se extraen las siguientes **CONCLUSIONES**:

1ª. El PCV2 se detecta en el ambiente tanto de granjas con Enfermedad Sistémica por PCV2, con infección subclínica y de granjas que vacunan a los lechones, siendo mayor su carga ambiental a medida que se agrava la infección. Además, los operarios suponen un riesgo importante en la epidemiología de esta infección ya que en su ropa y/o calzado pueden presentar niveles de PCV2 similares a las áreas en contacto directo con cerdos.

2ª. La distribución de PCV2 en el ambiente de las granjas difiere según el estado epidemiológico de la infección, lo que conlleva diferentes implicaciones para su control según sea la situación sanitaria:

   a. En situaciones con PCV2-SD, la contaminación con PCV2 es similar en todas las dependencias de las granjas. Así, las estrategias encaminadas a reducir la presencia del virus en el ambiente podrían actuar sinérgicamente con la vacunación, reduciendo la exposición de los cerdos al patógeno.

   b. En situaciones con PCV2-SI las salas de transición suelen ser las áreas más contaminadas con PCV2, seguidas por almacenes. De este modo, se deben aplicar medidas que minimicen la diseminación del virus desde dichas salas al resto de la granja, e incluir a los almacenes y sus elementos en los programas de limpieza y desinfección.

   c. En las granjas que vacunan a los lechones frente a PCV2, las oficinas son las dependencias más contaminadas, aunque en niveles similares a los almacenes y al perímetro de la granja. Así, es importante controlar la presencia de PCV2 en los almacenes ya que puede comprometer la eficacia del programa vacunal y la erradicación del virus. Además, no se puede descartar que el PCV2 de las oficinas y las áreas de carga tenga un origen externo.

3ª. A medida que se avanza en el control de la infección por PCV2, la importancia relativa de los operarios de las granjas se incrementa. Por tanto, es necesario involucrarles en las medidas de control de la infección por PCV2.

4ª. La detección de PCV2 en muestras ambientales de granjas con diferentes situaciones epidemiológicas indica que los planes de control y mejora sanitaria de PCV2 no se deben centrar únicamente en los cerdos, sino que también deben considerar el ambiente en el que viven.

5ª. La detección de PCV2 en aire y superficies siempre que se detecta viremia en un número representativo de cerdos, sumada a la buena correlación en su cantidad, señala que este tipo de muestreo puede ser una alternativa válida para la calificación de la viremia de PCV2 en la granja. Además, estas muestras permitieron detectar el PCV2 de forma más precoz que la detección de viremia en un número representativo de cerdos. Por estos motivos, el uso de estas técnicas en los programas de control de PCV2 puede contribuir a mejorar la eficiencia de los mismos.

6ª. Las muestras de aire a ras de suelo y a media altura, así como las muestras de las tolvas y las paredes de los corrales son las más adecuadas para la vigilancia de la infección por PCV2.

7ª. El muestreo del aire y de las superficies ha permitido caracterizar diversos efectos epidemiológicos positivos de la vacunación:

a. Los resultados indican que la vacunación retrasa la detección de PCV2 en el ambiente entre dos y seis semanas respecto a la no vacunación.

b. La cantidad de PCV2 en las granjas vacunadas fue de al menos 10^2 veces menor en las superficies y 10^3 veces en el aire, exceptuando la última toma de muestras, señalando la capacidad de las vacunas para reducir la exposición al patógeno.

8ª. Utilizando la detección ambiental de PCV2 se han permitido caracterizar los siguientes aspectos de las medidas de bioseguridad:

a. Los buzos y calzas convencionales que se utilizan en las visitas a las granjas de cerdos no son eficaces para evitar la contaminación por PCV2 de la ropa y del calzado. Por tanto, su uso debería sustituirse por EPI con certificación frente a agentes infecciosos, o bien por una ducha previa a la entrada y el uso de ropa y calzado proporcionado por la granja, y de uso exclusivo en la misma.

b. Los visitantes de las granjas en las que hay cerdos infectados por PCV2 se pueden contaminar con el virus presente en el ambiente, aun sin estar en contacto directo con los animales. Así, el uso de unos EPI apropiados debe acompañarse de un protocolo adecuado para su retirada, evitando así la contaminación accidental de la ropa y previniendo la diseminación de patógenos entre granjas.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

7. RESUMEN – RESUMO – ABSTRACT

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

RESUMEN

El Circovirus Porcino Tipo 2 (PCV2) es un virus no envuelto formado por una cadena simple de ADN. Este virus presenta una alta resistencia ambiental que hace que pueda ser infectivo para potenciales hospedadores durante un largo período de tiempo. El PCV2 presenta una gran especificidad de hospedador, siendo los cerdos y los jabalíes sus hospedadores naturales y los únicos animales que pueden desarrollar una enfermedad asociada a esta infección. Los cuadros clínicos asociados a esta infección son variados y pueden consistir en: infecciones subclínicas (PCV2-SI), enfermedad reproductiva (PCV2-RD), síndrome de Dermatitis y Nefropatía porcina (PDNS) y la Enfermedad Sistémica por PCV2 (PCV2-SD). La aparición y desarrollo de cualquiera de estos procesos está influenciado por diferentes factores, tales como la virulencia del genotipo vírico, estado inmunitario del hospedador y concurrencia de coinfecciones o las pautas de manejo llevadas a cabo en las granjas.

La distribución de la infección por PCV2 es global. En condiciones naturales, los cerdos se infectan a partir de los 2 – 3 meses de vida cuando han perdido su inmunidad maternal. La principal forma de transmisión es la horizontal. El virus se elimina por diferentes excreciones, siendo la vía fecal-oral la principal forma de contagio. La transmisión es muy eficiente extendiéndose rápidamente a través de la granja. Así, en condiciones sin vacunación se pueden llegar a observar seroprevalencias cercanas al 100 % a final de la etapa de cebo. La transmisión vertical también es posible, aunque de forma limitada.

La vacunación frente a PCV2 es esencial para el control de la infección y en la actualidad prácticamente todos los cerdos son vacunados frente al virus. La vacunación se aplica habitualmente a las 3 – 4 semanas de vida de los lechones y es capaz de proteger contra la infección hasta el último tercio de la fase de cebo. El uso de las vacunas ha conseguido reducir significativamente la prevalencia de infección. No obstante los intentos por lograr una posible erradicación no han sido exitosos.

Uno de los pilares de los sistemas de control es la vigilancia y monitorización de las granjas. De forma habitual, esto se realiza mediante la toma de muestras de sangre de los animales. Sin embargo, la vacunación masiva ha hecho que la prevalencia de infección en granjas vacunadas se encuentre normalmente en valores reducidos, aumentando el número necesario de animales a muestrear para detectar la infección, y por tanto los costes de los planes de control. Esto ha motivado la búsqueda de sistemas de muestreo alternativos que reduzcan los costes. En este sentido, la toma de muestras de superficies y de aire han mostrado ser alternativas muy eficientes para la detección de algunas enfermedades en especies de producción, al minimizar las muestras necesarias para detectar la infección en un colectivo. Dado que el PCV2 puede resistir largos períodos de tiempo en el ambiente, este tipo de muestras podría ser muy interesante para la detección de PCV2. Sin embargo, su aplicación al control

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

de PCV2 es muy limitada. De este modo, en este trabajo nos hemos propuesto analizar la presencia y distribución del virus en el ambiente de las granjas y evaluar la utilidad de las muestras de superficies y aire para la detección de PCV2 en diversos escenarios epidemiológicos.

En el **primer estudio** de esta Tesis Doctoral se pretendió determinar la posible presencia de ADN de PCV2 en muestras de diferentes superficies, fómites y operarios de granjas con PCV2-SD, PCV2-SI y de granjas que vacunan a los lechones (PCV2-VAC) para valorar sus posibles implicaciones en la epidemiología y el control de la infección por PCV2. Para ello, se seleccionaron nueve granjas con diferente situación epidemiológica: una granja con PCV2-SD, cuatro con PCV2-SI y cuatro con pauta de vacunación frente a PCV2 mantenida durante 7-8 años. Mediante la técnica del hisopado se tomaron muestras de superficies y elementos en diferentes instalaciones de estas granjas: las salas de partos, de transición, de gestación, los almacenes, las oficinas y el perímetro, así como de los operarios de dichas granjas. Los hisopos se eluyeron y se extrajo el ADN, el cual se analizó mediante PCR cuantitativa (qPCR) de PCV2 para detectar y cuantificar la cantidad de dicho virus.

En todas las granjas incluidas en el estudio se detectó ADN de PCV2 en las muestras del ambiente, aunque en una proporción estadísticamente diferente dependiendo del estado epidemiológico de la infección en dichas granjas. Así, en la granja con PCV2-SD el porcentaje de muestras ambientales positivas alcanzó el 83,87 %, mientras que en las granjas con PCV2-SI osciló entre el 13,89 % y el 51,28 %, y en las vacunadas entre el 2,63 % y el 32,43 %. Las muestras de la granja con PCV2-SD presentaron un número de copias significativamente mayor que las granjas con PCV2-SI. A su vez, las granjas con PCV2-SI presentaron recuentos mayores que las granjas con PCV2-VAC. Estos resultados muestran que la carga ambiental de PCV2 es mayor a medida que se agrava la enfermedad.

En la granja con PCV2-SD se detectó ADN de PCV2 en todas las dependencias, con una proporción de muestras positivas y carga vírica similar en todas ellas. Estos resultados indican que el PCV2 puede estar circulando por todos los grupos de cerdos en granjas con PCV2-SD. Además, la elevada carga ambiental de PCV2 expone a los lechones al virus ya desde una edad muy temprana, lo que facilita su infección. Por tanto, en las granjas con PCV2-SD, además de la vacunación, es muy importante la implementación de medidas encaminadas a reducir la presencia del virus en el ambiente ya que su persistencia en las superficies podría reducir la eficacia de los programas de vacunación.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

En el conjunto de granjas con PCV2-SI, la mayor carga ambiental de PCV2 se detectó en las salas de transición. De forma llamativa no se detectaron diferencias significativas entre esta dependencia con la carga detectada en los almacenes y las oficinas a pesar de la ausencia de contacto directo de estas salas con los animales.

Asimismo, tampoco se detectaron diferencias significativas con las muestras recogidas de los operarios. No obstante, se observó una tendencia decreciente en la carga vírica a medida que las dependencias se encontraron más alejadas de los animales y por tanto con un contacto con los cerdos que podría ser más esporádico. En cambio, en las salas de partos y de gestación la presencia del virus fue prácticamente nula y se limitó a una muestra positiva del pasillo de las salas de partos en una granja. La ausencia general de virus en estas zonas muestra que la circulación de este virus en granjas con PCV2-SI parece limitarse a los cerdos de transición. Los resultados positivos en operarios y utensilios de manejo sugieren que estos elementos podrían actuar como difusores del virus desde las salas de transición a otras dependencias de las granjas. De esta forma, se recomienda la aplicación de medidas que limiten esa diseminación e incluir a los almacenes, las oficinas, y sus elementos en los programas de limpieza y desinfección.

En las granjas con vacunación de lechones no se detectó ADN de PCV2 en el ambiente de las salas de transición, pero sí en las salas de gestación de una de las granjas. Estos resultados sugieren que, en una situación de vacunación de lechones, la atención al control de la infección por PCV2 se debe centrar más en las cerdas reproductoras. Además, las dependencias más frecuentemente contaminadas fueron las oficinas, seguidas por las muestras ambientales tomadas a los operarios, en el perímetro de la granja y en los almacenes. De este modo, en este trabajo se comprueba que el PCV2 se puede detectar en superficies de las granjas incluso cuando éstas pueden llevar varios años vacunando. La presencia ambiental del virus podría ser un motivo de los fallos de los programas de erradicación. Estos resultados ponen de manifiesto la necesidad de incluir la detección y monitorización ambiental del PCV2 en los programas de control y erradicación, siendo especialmente importante controlar la posible presencia del virus en almacenes, oficinas y en el perímetro de las granjas.

Además, este trabajo también muestra que la distribución ambiental del PCV2 en las granjas de producción es diferente según su estado sanitario. En consecuencia, las principales medidas de control a implementar también deberán ser diferentes. Por último es importante destacar que la importancia relativa de los operarios de las granjas se incrementa a medida que se avanza en el control sanitario de la infección por PCV2, pues ellos serán los responsables de la aplicación de las diferentes medidas de control.

En el **segundo estudio** de esta Tesis Doctoral se evaluó muestreo del aire y de las superficies de las granjas de cebo como una herramienta alternativa al muestreo de un número representativo de cerdos y la detección de su viremia de PCV2. Además, se estudió el efecto de la vacunación en la excreción de PCV2 a través de la detección y cuantificación del virus en el ambiente de las granjas. Para ello se monitorizaron tres bandas de cebo (dos con cerdos vacunados y una sin vacunar frente a PCV2)

procedentes de la misma granja de producción. Cada una se alojó en un cebadero y en cada una se tomaron muestras de sangre de 60 – 65 cerdos, seis muestras de aire (dos a ras de suelo, dos a media altura y dos a dos metros de altura); y cinco muestras de superficies (pasillo, tabique, comedero, pared y suelo de cuadras) cuando los animales tenían 10, 12, 14, 16 y 18 semanas de vida. Las muestras de sangre se organizaron en *pools* de cinco cerdos. A partir de cada uno de éstos, y de cada muestra de aire y de superficie se hizo una extracción de ADN, el cual a continuación se analizó mediante qPCR para detectar y cuantificar la cantidad de ADN de PCV2.

En las tres bandas de cebo se detectó viremia de PCV2, aunque en la banda sin vacunar (Control) se detectó antes que en ambos grupos vacunados (12 semanas de vida *vs* 14 y 18 semanas). La viremia y la prevalencia estimada de infección siempre fueron mayores en el Grupo Control que en los dos grupos vacunados a la misma edad. En cuanto a las muestras de aire, el virus también se detectó en las tres granjas, encontrándose antes en el Grupo Control (10 semanas de vida) que en los vacunados (12 y 18 semanas de vida en cada grupo), y la carga vírica fue 10^3 veces mayor en el Grupo Control, excepto en el último muestreo, en el cual fue similar en todos los grupos. Respecto a las superficies de la granja, los resultados siguieron la misma línea: el PCV2 se detectó en las tres granjas, pero de nuevo de forma más temprana en el Grupo Control (10 semanas de vida) que en los grupos vacunados (12 y 16 semanas de vida en cada uno).

Las técnicas de detección ambiental permitieron detectar el PCV2 de forma más precoz que el análisis de la viremia mediante el muestreo de un número representativo de cerdos. En los tres grupos se detectó el PCV2 en superficies con anterioridad a la detección de viremia. Con las muestras de aire la situación fue similar, siendo de nuevo la detección más precoz en dos de los tres grupos. Además, se observó una buena y significativa correlación entre el promedio de copias de PCV2 detectadas en las muestras de aire y de superficies con la viremia en la población de cerdos (τ= 0,672 y τ= 0,746 para el aire y las superficies, respectivamente, $p < 0{,}001$ en ambos casos). Concretamente, las muestras de aire a ras de suelo y a media altura, así como las muestras de los comederos y las paredes de los corrales presentan la mejor correlación con la viremia en los cerdos.

Los resultados de este trabajo muestran que los muestreos de aire y de superficies de las granjas constituyen una alternativa válida y eficaz para la cuantificación de la viremia de PCV2, permitiendo además una detección más precoz. Así, su introducción en los programas de control de PCV2 puede ser beneficiosa y contribuir a la mejora de los mismos. Por otro lado, la baja contaminación ambiental detectada en las granjas vacunadas también nos sugiere que la vacunación no solamente resulta beneficiosa por la protección que confiere, sino también porque contribuye a minimizar la

contaminación ambiental posiblemente debido a que produce una reducción y retraso de la excreción viral.

Finalmente, en el **tercer estudio** de la presente Tesis Doctoral se aplicó la detección ambiental de PCV2 para valorar la eficacia de los equipos de protección individual (EPI) que se utilizan habitualmente durante las visitas a las granjas de cebo, como una forma de evaluar el nivel de bioseguridad que se mantiene durante dichas visitas.

Para ello, se simuló una visita a una granja de cerdos con presencia confirmada de PCV2. Se establecieron dos grupos de tres visitantes. El primer grupo utilizó EPI certificados (Grupo EPI Certificado): buzos y calzas con protección certificada frente a agentes infecciosos y partículas sólidas y resistentes a la punción y a la tracción. Las buzos se colocaron sobre la ropa de calle y las calzas sobre unos cubrezapatos y el calzado de calle. Los tres componentes de este grupo llevaron la capucha colocada en todo momento. El otro grupo (Grupo EPI Convencional) colocó sobre esos mismos buzos certificados otros convencionales y, en vez de utilizar calzas certificadas, solamente utilizó unas calzas convencionales sobre los cubrezapatos y el calzado de calle. En este caso, los visitantes no utilizaron la capucha. Los visitantes de ambos grupos no tuvieron contacto en ningún momento con los cerdos. Antes de entrar a la granja, y tras finalizar la visita, se utilizó el método del hisopado para tomar muestras del pelo, los buzos externos e internos (o ropa de calle), calzas, cubrezapatos y calzado de calle. Además, se tomaron tres muestras ambientales de los pasillos de la granja y de la pared de los corrales. Todas las muestras se procesaron de igual modo que en los estudios anteriores para detectar y cuantificar la presencia de PCV2.

Se confirmó la ausencia de ADN de PCV2 en las muestras control tomadas a los EPI y al pelo antes de entrar a la granja. No obstante, al salir el 43,75 % de las muestras del Grupo EPI Certificado fueron positivas, mientras que en el Grupo EPI convencional este porcentaje alcanzó el 72,22 %. Las protecciones más externas (calzas y buzos) se contaminaron con PCV2 en los seis visitantes, en cantidades similares en los dos grupos y ligeramente inferior a la cuantificada en las muestras del pasillo y de las paredes de los corrales. Del mismo modo, también se detectó en el pelo de un visitante del grupo que no llevaba puesta la capucha. Respecto a los elementos colocados inmediatamente bajo los buzos externos, se detectó ADN de PCV2 en un visitante de cada grupo, a pesar de no apreciar daños en los buzos externos. No obstante, en los elementos del calzado se observó un comportamiento diferente entre los dos grupos. Mientras que en el Grupo EPI Certificado no se observó PCV2 en los elementos bajo las calzas, en el Grupo EPI Convencional sí se detectó ADN vírico en los cubrezapatos de los tres visitantes, y en dos muestras de su calzado de calle. La cantidad de PCV2 en estos cubrezapatos fue mayor que la cuantificada en las calzas en contacto directo con el suelo de la granja.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

Estos resultados señalan la contaminación con PCV2 durante las visitas a las granjas infectadas incluso sin contacto con los cerdos. Así, en este estudio se ha comprobado que las calzas y buzos convencionales utilizados en las visitas a las granjas de cerdos no son eficaces para evitar la contaminación de los elementos situados bajo ellos, siendo recomendable su sustitución por EPI certificados o bien por el uso de ropa de uso exclusivo y proporcionada por la granja. La detección de ADN vírico debajo de los EPI certificados en un visitante probablemente es debida a una contaminación durante su retirada. Esto señala la necesidad de un protocolo adecuado para el uso de estos elementos, de modo que se evite la contaminación accidental de la ropa y el calzado.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

RESUMO

O Circovirus Porcino Tipo 2 (PCV2) é un virus non envolto formado por unha cadea simple de ADN. Este virus presenta unha alta resistencia ambiental que fai que poida ser infectivo para potenciais hospedeiros durante un longo período de tempo. O PCV2 presenta unha gran especificidade de hospedeiro, sendo os porcos e os xabarís os seus hospedeiros naturais e os únicos animais que poden desenvolver unha enfermidade asociada a esta infección. Os cadros clínicos asociados a esta infección son variados e poden consistir en: infeccións subclínicas (PCV2-SI), enfermidade reprodutiva (PCV2-RD), síndrome de Dermatite e Nefropatía Porcina (PDNS) e a Enfermidade Sistémica por PCV2 (PCV2-SD). A aparición e desenvolvemento de calquera destes procesos está influenciado por diferentes factores, tales como a virulencia do xenotipo vírico, estado inmunitario do hospedeiro e a concorrencia de coinfeccións ou pautas de manexo levadas a cabo nas granxas.

A distribución da infección por PCV2 é global. En condicións naturais, os porcos inféctanse a partir dos 2 – 3 meses de vida cando perderon a súa inmunidade maternal. A principal forma de transmisión é a horizontal. O virus elimínase por diferentes excrecións, sendo a vía fecal-oral a principal forma de contaxio. A transmisión é moi eficiente estendéndose rapidamente a través da granxa. Así, en condicións sen vacinación pódense chegar a observar seroprevalencia próximas ao 100 % a final da etapa de cebo. A transmisión vertical tamén é posible, aínda que de forma limitada.

A vacinación fronte a PCV2 é esencial para o control da infección e na actualidade practicamente todos os porcos son vacinados fronte ao virus. A vacinación aplícase habitualmente as 3 – 4 semanas de vida dos leitóns e é capaz de protexer fronte á infección ata o último terzo da fase de cebo. O uso das vacinas conseguiu reducir significativamente a prevalencia de infección. Sen embargo, os intentos por lograr unha posible erradicación non foron exitosos.

Un dos piares dos sistemas de control é a vixilancia e monitorización das granxas. Habitualmente isto realízase mediante a toma de mostras de sangue dos animais. Sen embargo, a vacinación masiva fixo que a prevalencia de infección nas granxas vacinadas se atope normalmente en valores reducidos, aumentando o número de animais requiridos nas mostraxes para detectar a infección, e por tanto os custos dos plans de control. Isto motivou a procura de sistemas de mostraxe alternativos que minimicen os custos. Neste sentido, a toma de mostras de superficies e de aire mostraron ser alternativas moi eficientes para a detección de algunhas enfermidades en animais de produción, ao minimizar as mostras necesarias para detectar a infección nun colectivo. Dado que o PCV2 pode resistir largos períodos de tempo no ambiente, este tipo de mostras podería ser moi interesante para a detección de PCV2. Sen embargo, a súa aplicación ao control de PCV2 é moi limitada. Deste xeito, neste traballo propuxémonos analizar a presencia e distribución do virus no ambiente das

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

granxas e avaliar a utilidade das mostras de superficies e aire para a detección de PCV2 en diversos escenarios epidemiolóxicos.

No **primeiro estudo** desta Tese de Doutoramento pretendeuse determinar a posible presencia de ADN de PCV2 en mostras de diferentes superficies, fomites e operarios de granxas con PCV2-SD, PCV2-SI e de granxas que vacinan aos leitóns (PCV2-VAC) para valorar as súas posibles implicacións na epidemioloxía e control da infección por PCV2. Para iso, seleccionáronse nove granxas con diferente situación epidemiolóxica: unha granxa con PCV2-SD, catro con PCV2-SI e catro con pauta de vacinación fronte a PCV2 mantida durante 7-8 anos. Mediante a técnica do hisopado tomáronse mostras de superficies e diferentes elementos en diferentes instalacións desas granxas: as salas de partos, de transición, de xestación, dos almacéns, das oficinas e do perímetro, ademais dos operarios de ditas granxas. Os hisopos eluíronse e extraeuse o ADN, o cal se analizou mediante PCR cuantitativa (qPCR) de PCV2 para detectar e cuantificar a cantidade de dito virus.

En todas as granxas incluídas no estudo detectouse ADN de PCV2 nas mostras do ambiente, aínda que en proporción estatisticamente diferente dependendo do estado epidemiolóxico da infección nas granxas. Así, na granxa con PCV2-SD a porcentaxe de mostras ambientais positivas alcanzou o 83,87 %, mentres que nas granxas con PCV2-SI oscilou entre o 13,89 % e o 51,28 %, mentres que nas vacinadas foi entre o 2,63 % e o 32,32 %. As mostras da granxa con PCV2-SD presentaron un número de copias significativamente maior que as granxas con PCV2-SI. A súa vez, as granxas con PCV2-SI presentaron recontos maiores que as granxas con PCV2-VAC. Estes resultados mostran que a carga ambiental de PCV2 é maior a medida que se agrava a enfermidade.

Na granxa con PCV2-SD detectouse ADN de PCV2 en todas as dependencias, con unha proporción de mostras positivas e carga vírica similar en todas elas. Estes resultados indican que o PCV2 pode estar circulando por todos os grupos de porcos en granxas con PCV2-SD. Ademais, a elevada carga ambiental de PCV2 expón aos leitóns ao virus xa dende unha idade moi temperá, o que facilita a súa infección. Polo tanto, nas granxas con PCV2-SD, ademais da vacinación, e moi importante a implantación de medidas encamiñadas a reducir a presencia do virus no ambiente xa que a persistencia nas superficies podería reducir a eficacia dos programas de vacinación.

No conxunto de granxas con PCV2-SI, a maior carga ambiental de PCV2 detectouse nas salas de transición. De forma salientable, non se detectaron diferenzas significativas entre esta dependencia coa carga detectada nos almacéns e as oficinas a pesar da ausencia de contacto directo destas salas cos animais. Do mesmo xeito, tampouco se detectaron diferencias significativas coas mostras recollidas dos operarios. Sen embargo, observouse unha tendencia decrecente na carga vírica a medida que as dependencias estaban mais distantes dos animais e polo tanto con un

contacto cos porcos que podería ser mais esporádico. En cambio, nas salas de partos e de xestación a presencia de do virus foi practicamente nula e limitouse a unha mostra positiva nos corredores das salas de partos dunha granxa. A ausencia xeral de virus nesas zonas mostra que a circulación deste virus en granxas con PCV2-SI parece limitarse aos porcos en transición. Os resultados positivos en mostras de operarios e de utensilios de manexo suxiren que estes elementos poderían actuar como difusores do virus dende as salas de transición ata outras dependencias. Desta forma, recoméndase a aplicación de medidas que limiten esa diseminación e incluír os almacéns, as oficinas e os seus elementos nos programas de limpeza a desinfección.

Nas granxas con vacinación de leitóns non se detectou ADN de PCV2 no ambiente das salas de transición, pero si nas de xestación dunha das granxas. Estes resultados suxiren que, nunha situación de vacinación de leitóns, a atención ao control da infección por PCV2 débese centrar máis nas porcas reprodutoras. Ademais, as dependencias mais frecuentemente contaminadas foron as oficinas, seguidas polas mostras ambientais tomadas aos operarios das granxas, no perímetro da granxa e nos almacéns. Deste xeito, neste traballo compróbase que o PCV2 pódese detectar en superficies das granxas incluso cando estas levan varios anos vacinando. A presencia ambiental do virus podería ser un dos motivos dos fallos dos programas de erradicación. Estes resultados poñen de manifesto a necesidade de incluír, a detección e monitorización ambiental do PCV2 nos programas de control e erradicación, sendo especialmente importante controlar a posible presencia do virus en almacéns, oficinas e perímetro das granxas.

Ademais, este traballo tamén mostra que a distribución ambiental do PCV2 nas granxas de produción é diferente segundo o seu estado sanitario. En consecuencia, as principais medidas a implantar tamén deberían ser diferentes. Por último, é importante destacar que a importancia relativa dos operarios das granxas se incrementa a medida que se avanza no control sanitario da infección por PCV2, pois eles serán os responsables da aplicación das diferentes medidas de control.

No **segundo estudo** desta Tese de Doutoramento avaliouse a mostraxe do aire e das superficies das granxas de cebo como unha ferramenta alternativa á mostraxe dun número representativo de porcos e a detección da súa viremia de PCV2. Ademais, estudiouse o efecto da vacinación na excreción de PCV2 a través da súa detección e cuantificación do virus no ambiente das granxas. Para elo, monitorizáronse tres bandas de cebo (dúas con porcos vacinados e unha sen vacinar fronte a PCV2) procedentes da mesma granxa de produción. Cada unha aloxouse nun cebadeiro e en cada unha tomáronse mostras de sangue de 60 – 65 porcos, seis mostras de aire (dúas a ras do chan, dúas a media altura e dúas a dous metros de altura); e cinco mostras de superficies (corredor, tabique, comedeiro, parede e chan dos cortellos) cando os animais tiñan 10, 12, 14, 16 e 18 semanas de vida. As mostras de sangue organizáronse en

pools de cinco porcos. A partir de cada un destes, e de cada mostra de aire e de superficie fíxose unha extracción de ADN, a cal a continuación se analizou mediante qPCR de PCV2 para detectar e cuantificar a cantidade de ADN de PCV2.

Nas tres bandas de cebo detectouse viremia de PCV2, aínda que na banda sen vacinar (Control) detectouse antes que en ambos grupos vacinados (12 semanas de vida *vs* 14 e 18 semanas). A viremia e a prevalencia estimada de infección foi sempre maior no Grupo Control que nos dous grupos vacinados á mesma idade. En canto ás mostras de aire, o virus tamén se detectou antes nas tres granxas, encontrándose antes no Grupo Control (10 semanas de vida) que nos vacinados (12 e 18 semanas en cada grupo), e a carga vírica foi 10^3 veces superior no Grupo Control, excepto na última mostraxe, na cal foi similar nos tres grupos. Respecto as superficies da granxa, os resultados seguiron a mesma liña: o PCV2 detectouse nas tres granxas, pero de novo de forma mais temperá no Grupo Control (10 semanas de vida) que nos vacinados (12 e 16 semanas en cada grupo).

As técnicas de detección ambiental permitiron detectar PCV2 de forma mais precoz que o análise da viremia mediante a mostraxe dun número representativo de porcos. Nos tres grupos detectouse PCV2 en superficies con anterioridade á viremia. Coas mostras de aire a situación foi similar, sendo de novo a detección máis precoz en dous dos tres grupos. Ademais, observouse unha boa e significativa correlación entre a media de copias de PCV2 detectadas nas mostras de aire e de superficies coa viremia na poboación de porcos (τ = 0,672 y τ= 0,746 para o aire e as superficies, respectivamente, $p < 0,001$ en ambos casos). En concreto, as mostras de aire a ras do chan e a media altura, así como as mostras dos comedeiros e das paredes dos cortellos presentan a mellor correlación coa viremia nos porcos.

Os resultados deste traballo mostran que as mostraxes de aire e de superficies das granxas constitúen unha alternativa válida e eficaz para a cuantificación da viremia de PCV2, permitindo ademais unha detección máis precoz. Así, a súa introdución nos programas de control de PCV2 pode ser beneficiosa e contribuír á mellora dos mesmos. Por outro lado, a baixa contaminación ambiental detectada nas granxas vacinadas tamén nos suxire que a vacinación non soamente resulta beneficiosa pola protección que confire aos porcos, senón tamén porque contribúe a minimizar a contaminación ambiental posiblemente porque produce unha diminución e retraso na excreción viral.

Finalmente no **terceiro estudo** da presente Tese de Doutoramento aplicouse a detección ambiental de PCV2 para valorar a eficacia dos equipos de protección individual (EPI) utilizados habitualmente nas visitas ás granxas de cebo, como unha forma de avaliar o nivel de bioseguridade que se mantén durante ditas visitas.

Para isto, simulouse unha visita a unha granxa de porcos con presenza confirmada de PCV2. Establecéronse dous grupos de tres visitantes. O primeiro grupo utilizou EPI

certificados (Grupo EPI Certificado): buzos e calzas con protección certificada fronte a axentes infecciosos e partículas sólidas e resistentes á punción e á tracción. Os buzos colocáronse sobre a roupa da rúa e as calzas sobre uns cubrezapatos e o calzado de rúa. Os tres compoñentes deste grupo levaron a capucha colocada en todo momento. O outro grupo (Grupo EPI Convencional) colocou sobre eses mesmos buzos certificados outros convencionais e, en vez de utilizar calzas certificadas, soamente utilizou unhas calzas convencionais sobre os cubrezapatos e o calzado de rúa. Neste caso, os visitantes non colocaron a capucha. Os visitantes de ambos grupos non tiveron contacto cos porcos en ningún momento. Antes de entrar á granxa, e tras finalizar a visita, utilizouse o método do hisopado para tomar mostras do pelo, buzos externos e internos (ou roupa de rúa), calzas, cubrezapatos e calzado de rúa. Ademais, tomáronse mostras ambientais dos corredores da granxa e da parede dos cortellos. Todas as mostras procesáronse do mesmo xeito que nos estudos anteriores para detectar e cuantificar a presencia de PCV2.

Confirmouse a ausencia de PCV2 nas mostras control tomadas aos EPI e ao pelo antes de entrar á granxa. Sen embargo, ao saír, o 43,75 % das mostras do grupo EPI Certificado foron positivas, mentres que no grupo EPI Convencional este porcentaxe alcanzou o 72,22 %. As protecciónS máis externas (calzas e buzos) contamináronse con PCV2 nos seis visitantes, en cantidades similares nos dous grupos e lixeiramente inferior á detectada nas mostras das superficies da granxa. Do mesmo xeito, tamén se detectou ADN de PCV2 no pelo dun visitante do grupo que non levaba posta a capucha. Respecto aos elementos colocados inmediatamente baixo os buzos externos, detectouse ADN de PCV2 nun visitante de cada grupo, a pesar de non apreciar dano en ditos buzos. Sen embargo, nos elementos do calzado observouse un comportamento diferente entre os dous grupos. Mentres que no grupo EPI Certificado non se observou PCV2 nos elementos baixo as calzas, no grupo EPI Convencional si se detectou ADN vírico nos cubrezapatos dos tres visitantes, e en dúas mostras do seu calzado de rúa. A cantidade de PCV2 nos cubrezapatos foi maior que a cuantificada nas calzas en contacto directo co chan da granxa.

Estes resultados sinalan a contaminación con PCV2 durante as visitas ás granxas infectadas incluso sen ter contacto cos porcos. Así, neste traballo comprobouse que as calzas e os buzos convencionales utilizados nas visitas as granxas de porcos non son eficaces para evitar a contaminación dos elementos situados baixo eles, sendo recomendable a súa substitución por EPI certificados ou ben polo uso de roupa de uso exclusivo e proporcionada pola granxa. A detección de ADN vírico debaixo dos EPI certificados nun visitante probablemente se deba a unha contaminación durante a súa retirada. Isto sinala a necesidade dun protocolo adecuado para o uso destes elementos, de modo que se evite a contaminación accidental da roupa e do calzado.

ABSTRACT

Porcine Circovirus Type 2 (PCV2) is a non-enveloped single-stranded DNA virus. This virus is highly resistant in the environment and can, therefore, remain infective for potential hosts for a long time. PCV2 is a very host specific virus whose natural hosts, which are pigs and wild boars, are the only animals which can develop the disease. The clinical signs associated with this infection are diverse and can entail: subclinical infections (PCV2-SI), reproductive disease (PCV2-RD), porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS) and PCV2 Systemic Disease (PCV2-SD). The emergence and development of any of these processes is influenced by different factors, such as the virulence of the viral genotype, the immune status of the host and the concurrence of coinfections or the management guidelines carried out on farms.

The distribution of PCV2 infection is global. In natural conditions, pigs get infected at 2-3 months of age, when they have lost their maternal immunity. Horizontal transmission is the main source of infection, especially the faecal-oral means of transmission, provided that the virus can be shed in several excretions. The transmission is very efficient, and the virus can rapidly spread throughout the farm. Thus, in unvaccinated conditions, a seroprevalence rate of almost 100% can be observed at the end of the fattening phase. Vertical transmission is also possible, although limited.

Vaccination against PCV2 is essential for the control of the infection and, nowadays, almost all pigs are vaccinated against the virus. Vaccination is usually administered when pigs are 3-4 weeks old and can protect them against the infection until the last third of the fattening phase. The use of vaccines has enabled the significant reduction of the infection prevalence. However, the attempts to achieve a possible eradication have not been successful yet.

One of the cornerstones of disease control systems is the surveillance and monitoring of the farms. On a regular basis, blood samplings of the animals are performed to achieve this. Nevertheless, mass vaccination has reduced the infection prevalence in vaccinated farms to low rates. Consequently, the number of animals that must be sampled to detect the infection has increased and, thus, the cost of the control and eradication plans against the infection. This has led to the quest for alternative sampling methods which reduce that cost. In this regard, the sampling of surfaces and/or air have proved to be highly effective alternatives for the detection of some diseases in production animals, as they minimise the number of necessary samples to detect the infection in a collective. Provided that PCV2 can resist in the environment for a long time, these types of samples could be very interesting for the detection of PCV2. However, the usage of these methods to control PCV2 is very limited. Thus, in this work, we aimed to analyse the presence and distribution of the virus in the

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

environment of the farm and to evaluate the usefulness of surface and air samples to detect PCV2 in diverse epidemiological scenarios.

In the **first study** of this Doctoral Thesis, the aim was to determine the potential presence of PCV2 DNA in samples from different surfaces, fomites and staff from farms with PCV2-SD, PCV2-SI and farms which vaccinate the piglets (PCV2-VAC), to assess their potential implications in the epidemiology and control of the PCV2 infection. In order to do so, nine farms with different epidemiological situations were selected: one farm with PCV2-SD, four with PCV2-SI and four which had been vaccinating against PCV2 for 7-8 years. Through the swabbing technique, samples were taken from different surfaces and elements in different facilities of these farms: farrowing rooms, transition and gestation areas, warehouses, offices and the perimeter, as well as from the staff of these farms. The swabs were eluted, and DNA was extracted and analysed by PCV2 qPCR to detect and quantify the viral load.

In all the farms included in the study, PCV2 DNA was detected in the environmental samples, although in a statistically different proportion according to the epidemiological status of the farm. Thus, in the PCV2-SD farm, the percentage of positive samples reached 83.87%, while in the PCV2-SI farm, it ranged from 2.63% to 32.43%. The samples from the PCV2-SD farm showed higher viral loads that those from the PCV2-SI farms. Likewise, the PCV2-SI farms showed higher counts that the PCV2-VAC ones. These results show that the PCV2 environmental load increases as the disease becomes more severe.

In the PCV2-SD farm, PCV2 DNA was detected in all the facilities, with a similar proportion of positive samples and viral load in all of them. These results indicate that PCV2 may be circulating across all the pig groups in the PCV2-SD farms. Moreover, the high PCV2 viral load exposes the piglets to the virus from a very early age, so that get infected more easily. Therefore, in PCV2-SD farms, apart from vaccination, the implementation of measures to reduce the environmental presence of the virus is very important, provided that its persistence on surfaces could reduce the effectiveness of vaccination programmes.

In the set of PCV2-SI farms, the highest PCV2 environmental load was detected in the transition area. Remarkably, no significant differences were detected between the viral load found in this facility and that detected in the warehouse and the office, although in those areas there was no direct contact with the animals. Likewise, no significant differences were detected between these samples and those taken from the farm staff. Nevertheless, the viral load showed a decreasing tendency as the facilities were further away from the animals. In contrast, the presence of the virus was practically non-existent in the farrowing rooms and in the gestation areas, as it was limited to one positive sample in the corridor of the farrowing room in one of the farms. The general absence of the virus in these areas shows that the circulation of PCV2

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

may be limited to the transition pigs. The positive results of the samples taken from the staff and the management tools suggest that these elements could act as viral diffusers from the transition areas to other facilities of the farms. Thus, the implementation of measures which limit that dissemination is recommended, and warehouses, offices and their elements must be included in cleaning and disinfection programmes.

In farms which vaccinate piglets, PCV2 DNA was not detected in the environment of the transition area, but it was found in the gestation area of one of the farms. These results suggest that, in a situation in which piglets are vaccinated, the control of the PCV2 infection must focus on reproductive sows. Moreover, the most frequently contaminated facilities were the offices, followed by the environmental samples taken from the staff, the farm perimeter, and the warehouses. Thus, this work proves that PCV2 can be detected in surfaces even when the farm has been vaccinating against it for years. The environmental presence of the virus could be one of the reasons why eradication programmes fail. These results highlight the need to include PCV2 detection and environmental monitoring in control and eradication programmes, being particularly important to control the potential presence of the virus in warehouses, offices and the perimeter of the farms.

Moreover, this study also brings forward that the environmental distribution of PCV2 in production farms is different according to their sanitary status. Consequently, the main control measures that must be implemented should also be different. Finally, the relative importance of the farm workers in the sanitary control of the infection must be emphasised, provided that they are responsible for the implementation of the different control measures.

In the **second study** of this Doctoral Thesis, the sampling of air and surfaces of fattening farms was evaluated as an alternative tool to the blood sampling of a representative number of pigs and the detection of their PCV2 viremia. Moreover, the effect of vaccination in the excretion of PCV2 was studied through the detection and quantification of the virus in the environment of the farms. In order to do so, three fattening batches from the same production farm were monitored (two of them were vaccinated and one of them was not). Each one was housed in a feedlot and, in each one, blood samples from 60-65 pigs were taken, as well as six air samples (two at ground level, two at medium height and two at two metres high), and five surface samples (from the corridor, the pen railing, the hopper, the pen wall and the pen floor). The samples were taken when the animals were 10, 12, 14, 16 and 18 weeks of age. The blood samples were organised in pools of five animals. From each pool and from each air and surface sample, DNA was extracted and subsequently analysed by qPCR to detect and quantify the amount of PCV2 DNA.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

In the three fattening batches, PCV2 viremia was detected, but it was found earlier in the unvaccinated batch (Control) than in both vaccinated batches (12 weeks of age vs. 14 and 18 weeks). The viremia and estimated infection prevalence were always higher in the Control Group than in both vaccinated groups at the same age. Regarding air samples, the virus was also detected in the three farms, but it was also found earlier in the Control Group (10 weeks of age) than in the vaccinated ones (12 and 18 weeks of age, respectively), and the viral load of the Control group was 10^3 times higher in every sampling, except for the last one, in which the viral loads were similar in all the groups. With respect to the surfaces of the farm, the results were in line with the aforementioned: PCV2 was detected in the three farms, but again it was found earlier in the Control Group (10 weeks of age) than in the vaccinated ones (12 and 16 weeks of age, respectively).

The environmental detection methods enabled the detection of PCV2 earlier than the analysis of viremia by conducting blood samplings in a representative number of pigs. Throughout the three groups, PCV2 was detected earlier in surfaces than in the blood samples. Regarding air samples, the situation was similar, as their use enabled the earliest detection of the virus in two of the three groups. Moreover, a good and significant correlation between the average number of PCV2 copies detected in air and surface samples and the viremia in the pig population was observed (τ= 0,672 y τ= 0,746 for air and surface samples, respectively, $p < 0{,}001$ in both cases). Namely, air samples at ground level and at medium height, as well as hopper samples and pen walls show the best correlation with pig viremia.

The results of this study bring forward that surface and air samplings on farms constitute a valid and effective alternative to the quantification of PCV2 viremia, besides enabling an earlier detection. Thus, their introduction in PCV2 control programmes can be advantageous and contribute to their improvement. Moreover, the low environmental contamination levels detected in vaccinated farms also suggest that vaccination is not only beneficial due to the protection it confers, but also because it contributes to minimize environmental contamination, possibly because it reduces and delays the viral excretion.

Finally, in the **third study** of this Doctoral Thesis, PCV2 environmental detection was applied to assess the effectiveness of Personal Protective Equipment (PPE) that is regularly worn during visits to fattening farms, as a way to evaluate the level of biosecurity that is maintained during those visits.

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

In order to do so, a visit to a PCV2 infected farm was simulated. Two groups of three visitors each were established. The first group used certified PPE (Certified PPE Group): jumpsuits and boot covers with certified protection against infectious agents and solid particles, which were also puncture and traction resistant. Jumpsuits were worn over streetwear and the boot covers over shoe covers and footwear. The three

people in this group had their hoods placed over their heads at all times. The other group (Conventional PPE Group) wore conventional jumpsuits over the certified ones and, instead of using certified boot covers, only wore conventional boot covers over their shoe covers and footwear. In this case, the visitors did not use the hood. The visitors from both groups did not have any contact with the pigs. Before going into the farm and after the visit was finished, a swabbing method was used to sample the hair, the outside and inside jumpsuits (or streetwear), boot covers, shoe covers and streetwear. Moreover, three environmental samples from the corridors of the farm and the pen walls were taken. All the samples were processed in the same way as in the prior studies to detect and quantify the presence of PCV2.

The absence of PCV2 DNA in the control samples taken from the PPE and the hair before entering the farm was confirmed. Nevertheless, after leaving the farm 43,75% of the samples from the Certified PPE Group were positive, but in the Conventional PPE Group this percentage reached 72,22%. The most external protections (boot covers and jumpsuits) were contaminated with PCV2 in the six visitors, in similar quantities in both groups, which are slightly lower than the load detected in the samples from the corridors and the pen walls. Likewise, the virus was also found in the hair of one of the visitors from the group that did not wear a hood. Regarding the elements which were worn immediately under the external jumpsuits, PCV2 DNA was detected in one visitor from each group, although no damage could be seen in the coveralls. However, in footwear, a difference in performance was seen between both groups. While in the Certified PPE Group no PCV2 DNA was found in the elements under the shoe covers, in the Conventional PPE Group PCV2 DNA was detected in the shoe covers of the three visitors and in two footwear samples. The amount of PCV2 detected in these shoe covers was higher than that from the boot covers in direct contact with the farm floor.

These results show that contamination with PCV2 occurs during visits to the infected farms even without any contact with the pigs. Thus, this study proves that conventional jumpsuits and boot covers used in visits to swine farms are not effective to avoid the contamination of the elements worn under them, and should be replaced with certified PPE or with clothing supplied by the farm for use only on its premises. The detection of viral DNA under the certified PPE in one of the visitors is probably due to a contamination during its removal. This points out the need for an adequate protocol for the use of these elements, so that accidental contamination of clothing and footwear is avoided.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

8. BIBLIOGRAFÍA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Adell, E., Moset, V., Zhang, Y., Jiménez-Belenguer, A., Cerisuelo, C., Cambra-López, M., 2014. Comparative performance of three sampling techniques to detect airborne *Salmonella* species in poultry farms. Ann Agric Environ Med 21, 15–24.

Afghah, Z., Webb, B., Meng, X.J., Ramamoorthy, S., 2017. Ten years of PCV2 vaccines and vaccination: Is eradication a possibility? Vet Microbiol 206, 21–28. doi:10.1016/j.vetmic.2016.10.002

Afolabi, K.O., Iweriebor, B.C., Okoh, A.I., Obi, L.C., 2017. Global Status of Porcine circovirus Type 2 and Its Associated Diseases in Sub-Saharan Africa. Adv Virol 2017, 1–16. doi:10.1155/2017/6807964

Ahmed M.F.E.M., Schulz, J., Hartung, J., 2013. Air samplings in a *Campylobacter jejuni* positive laying hen flock. Ann Agric Environ Med 20, 16–20.

Alarcón, L.V., Alberto, A.A., Mateu, E., 2021. Biosecurity in pig farms: a review. Porc Heal Manag 1–15. doi:10.1186/s40813-020-00181-z

Alarcon, P., Rushton, J., Wieland, B., 2013. Cost of post-weaning multi-systemic wasting syndrome and porcine circovirus type-2 subclinical infection in England - An economic disease model. Prev Vet Med 110, 88–102. doi:10.1016/j.prevetmed.2013.02.010

Alarcon, P., Velasova, M., Mastin, A., Nevel, A., Stärk, K.D.C., Wieland, B., 2011. Farm level risk factors associated with severity of post-weaning multi-systemic wasting syndrome. Prev Vet Med 101, 182–191. doi:10.1016/j.prevetmed.2011.06.001

Allan, G.M., Ellis, J.A., 2000. Porcine circoviruses: a review. J Vet Diagn Invest 12, 3–14.

Allan, G.M., Mcneilly, F., Mcnair, I., Curran, M.D., Walker, I., Ellis, J., 2000. Absence of evidence for porcine circovirus type 2 in cattle and humans, and lack of seroconversion or lesions in experimentally infected sheep. Arch Virol 145, 853–857.

Allan, G.M., Neilly, F.M., Meehan, B.M., Kennedy, S., Mackie, D.P., Ellis, J.A., Clark, E.G., Espuna, E., Saubi, N., Riera, P., Botner, A., Charreyre, C.E., 1999. Isolation and characterisation of circoviruses from pigs with wasting syndromes in Spain, Denmark and Northern Ireland. Vet Microbiol 66, 115–123.

Allan, G.M., McNeilly, F., Kennedy, S., Daft, B., Clarke, E.G., Ellis, J.A., Haines, D.M., Meehan, B.M., Adair, B.M., 1998. Isolation of Porcine Circovirus-like Viruses from Pigs with a Wasting Disease in the USA and Europe. J Vet Diagn Invest 10, 3–10. doi:10.1177/104063879801000102

Allepuz, A., Saez, M., Solymosi, N., Napp, S., Casal, J., 2009. The role of spatial factors in the success of an Aujeszky's disease eradication programme in a high pig density area (Northeast Spain, 2003-2007). Prev Vet Med 91, 153–160. doi:10.1016/j.prevetmed.2009.06.005

Allerson, M.W., Cardona, C.J., Torremorell, M., 2013. Indirect Transmission of Influenza A Virus between Pig Populations under Two Different Biosecurity Settings. PLoS One 8. doi:10.1371/journal.pone.0067293

Alonso, C., 2019a. Fómites de dos patas: entrada biosegura para el personal de la granja. www.3tres3.com. URL https://www.3tres3.com/articulos/fomites-de-dos-patas-entrada-biosegura-para-el-personal-de-la-granja_41049/

Alonso, C., 2019b. Bioseguridad en las cargas. Cómo minimizar un riesgo inevitable durante el movimiento de animales. www.3tres3.com. URL https://www.3tres3.com/articulos/bioseguridad-durante-el-movimiento-de-animales_41242/

Alonso, C., Raynor, P.C., Davies, P.R., Torremorell, M., 2015. Concentration, Size Distribution, and Infectivity of Airborne Particles Carrying Swine Viruses. PLoS One 10, 1–12. doi:10.1371/journal.pone.0135675

Alonso, C., Goede, D.P., Morrison, R.B., Davies, P.R., Rovira, A., Marthaler, D.G., Torremorell, M., 2014. Evidence of infectivity of airborne porcine epidemic diarrhea virus and detection of airborne viral RNA at long distances from infected herds. Vet Res 45. doi:10.1186/s13567-014-0073-z

Anderson, B.D., Yondon, M., Bailey, E.S., Duman, E.K., Simmons, R.A., Greer, A.G., Gray, G.C., 2020. Environmental Bioaerosol Surveillance as an Early Warning System for Pathogen Detection in North Carolina Swine Farms: A Pilot Study. Transbound Emerg Dis 1–7. doi:10.1111/tbed.13683

Anderson, B.D., Lednicky, J.A., Torremorell, M., Gray, G.C., 2017. The use of bioaerosol sampling for airborne virus surveillance in swine production facilities: A mini review. Front Vet Sci 4, 1–8. doi:10.3389/fvets.2017.00121

Anderson, B.D., Ma, M., Xia, Y., Wang, T., Shu, B., Lednicky, J.A., Ma, M.J., Lu, J., Gray, G.C., 2016. Bioaerosol sampling in modern agriculture: A novel approach for emerging pathogen surveillance? J Infect Dis 214, 537–545. doi:10.1093/infdis/jiw180

Andraud, M., Grasland, B., Durand, B., Cariolet, R., Jestin, A., Madec, F., Pierre, J.S., Rose, N., 2009a. Modelling the time-dependent transmission rate for porcine circovirus type 2 (PCV2) in pigs using data from serial transmission experiments. J R Soc Interface 6, 39–50. doi:10.1098/rsif.2008.0210

Andraud, M., Rose, N., Grasland, B., Pierre, J.S., Jestin, A., Madec, F., 2009b. Influence of husbandry and control measures on porcine circovirus type 2 (PCV-2) dynamics within a farrow-to-finish pig farm: A modelling approach. Prev Vet Med 92, 38–51. doi:10.1016/j.prevetmed.2009.07.009

Andraud, M., Grasland, B., Durand, B., Cariolet, R., Jestin, A., Madec, F., Rose, N., 2008. Quantification of porcine circovirus type 2 (PCV-2) within- and between-pen transmission in pigs. Vet Res 39, 39–43. doi:10.1051/vetres:2008020

Aramouni, M., Segalés, J., Sibila, M., Martin-Valls, G.E., Nieto, D., Kekarainen, T., 2011. Torque teno sus virus 1 and 2 viral loads in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) and porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS) affected pigs. Vet Microbiol 153, 377–381. doi:10.1016/j.vetmic.2011.05.046

Arruda, P.H.E., Gauger, P., 2019. Optimizing Sample Selection, Collection, and Submission to Optimize Diagnostic Value, in Zimmerman, J.J., Karriker, L.A., Ramirez, A., Schwartz, K.J., Stevenson, G.W., Zhang, J. (Eds.), Diseases of Swine. Wiley-Blackwell, 11th edition, pp. 749–766.

Backhans, A., Sjölund, M., Lindberg, A., Emanuelson, U., 2015. Biosecurity level and health management practices in 60 swedish farrow-to-finish herds. Acta Vet Scand 57. doi:10.1186/s13028-015-0103-5

Baekbo, P., Hassing, A., Olsen, P., Lorenzen, B., Wachmann, H., Lauridsen, C., 2004. Vitamin E and postweaning mortality in PMWS affected herds, in: Proceedings of the International Pig Veterinary Society Congress. Hamburgo, Alemania, p. 62.

Baker, S.R., Mondaca, E., Polson, D., Dee, S., 2012. Evaluation of a needle-free injection device to prevent hematogenous transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. J Swine Health Prod 20, 123–128.

Bangerter, P.D., Sidler, X., Perreten, V., Overesch, G., 2016. Longitudinal study on the colonisation and transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pig farms. Vet Microbiol 183, 125–134. doi:10.1016/j.vetmic.2015.12.007

Bao, F., Mi, S., Luo, Q., Guo, H., Tu, C., Zhu, G., Gong, W., 2018. Retrospective study of porcine circovirus type 2 infection reveals a novel genotype PCV2f. Transbound Emerg Dis 65, 432–440. doi:10.1111/tbed.12721

Barman, N.N., Nath, B., Kumar, V., Sen, A., Dutta, T.K., Dutta, B., Rahman, T., Kumar, S., 2018. The emergence of porcine circovirus 2 infections in the Northeastern part of India: A retrospective study from 2011 to 2017. Transbound Emerg Dis 65, 1959–1967. doi:10.1111/tbed.12977

Bassaganya-Riera, J., Pogranichniy, R.M., Jobgen, S.C., Halbur, P.G., Yoon, K.J., O'Shea, M., Mohede, I., Hontecillas, R., 2003. Conjugated linoleic acid ameliorates viral infectivity in a pig model of virally induced immunosuppression. J Nutr 133, 3204–3214. doi:10.1093/jn/133.10.3204

Battersby, T., Whyte, P., Bolton, D.J., 2016. The pattern of *Campylobacter* contamination on broiler farms; external and internal sources. J Appl Microbiol 120, 1108–1118. doi:10.1111/jam.13066

Beach, N.M., Meng, X., 2012. Efficacy and future prospects of commercially available and experimental vaccines against porcine circovirus type 2 (PCV2). Virus Res 164, 33–42. doi:10.1016/j.virusres.2011.09.041

Benjamini, Y., Hochberg, Y., 1995. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. J R Stat Soc Ser 57, 289–300.

Berry, N.L., Johnson, A.K., Hill, J., Lonergan, S., Karriker, L.A., Stalder, K.J., 2012. Loading gantry versus traditional chute for the finisher pig: Effect on welfare at the time of loading and performance measures and transport losses at the harvest facility1. J Anim Sci 90, 4028–4036. doi:10.2527/jas.2011-4973

Bigeriego, M., Canales, C., Colmenares, M., Piñeiro, C., Sanz, M.J., Illescas, P., Montalvo, G., 2006. Guía de mejores técnicas disponibles del sector porcino. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

Blunt, R., McOrist, S., McKillen, J., McNair, I., Jiang, T., Mellits, K., 2011. House fly vector for porcine circovirus 2b on commercial pig farms. Vet Microbiol 149, 452–455. doi:10.1016/j.vetmic.2010.11.019

Bolin, S.R., Stoffregen, W.C., Nayar, G.P.S., Hamel, A.L., 2001. Postweaning multisystemic wasting syndrome induced after experimental inoculation of cesarean-derived, colostrum-deprived piglets with type 2 porcine circovirus. J Vet Diagn Invest 13, 185–194. doi:10.1177/104063870101300301

Bonifait, L., Veillette, M., Grenier, D., Duchaine, C., 2014. Detection of *Streptococcus suis* in Bioaerosols of Swine Confinement. Appl Environ Microbiol 80, 3296–3304. doi:10.1128/AEM.04167-13

Brito, B., Dee, S., Wayne, S., Alvarez, J., Perez, A., 2014. Genetic diversity of PRRS virus collected from air samples in four different regions of concentrated swine production during a high incidence season. Viruses-Basel 6, 4424–4436. doi:10.3390/v6114424

Brumm, M.C., 2019. Effect of Environment on Health, 11th ed, Diseases of Swine. Wiley-Blackwell. doi:10.1002/9781119350927.ch4

Brunborg, I.M., Fossum, C., Lium, B., Blomqvist, G., Merlot, E., Jørgensen, A., Eliasson-Selling, L., Rimstad, E., Jonassen, C.M., Wallgren, P., 2010. Dynamics of serum antibodies to and load of porcine circovirus type 2 (PCV2) in pigs in three finishing herds, affected or not by postweaning multisystemic wasting syndrome. Acta Vet Scand 52, 22. doi:10.1186/1751-0147-52-22

Brunborg, I.M., Jonassen, C.M., Moldal, T., Bratberg, B., Lium, B., Koenen, F., Schönheit, J., 2007. Association of myocarditis with high viral load of porcine circovirus type 2 in several tissues in cases of fetal death and high mortality in piglets . A case study. J Vet Diagn Invest 19, 368–375.

Brunborg, I.M., Modal, T., Jonassen, C.M., 2004. Quantitation of porcine circovirus type 2 isolated from serum/plasma and tissue samples of healthy pigs and pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome using a TaqMan-based real-time PCR. J Virol Methods 122, 171–178. doi:10.1016/j.jviromet.2004.08.014

Buxadé, C., Marco, E., López, D., 2007. Optimización de la estrategia y de la logística de los ciclos productivos de la C.R.A.P., in: La Cerda Reproductora: Claves de Su Optimización Productiva. Editorial Euroganadería, pp. 479–516.

Calsamiglia, M., Fraile, L., Espinal, A., Cuxar, A., Seminati, C., Martín, M., Mateu, E., Domingo, M., Segalés, J., 2007. Sow porcine circovirus type 2 (PCV2) status effect on litter mortality in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). Res Vet Sci 82, 299–304. doi:10.1016/j.rvsc.2006.08.007

Carasova, P., Celer, V., Takacova, K., Trundova, M., Molinkova, D., Lobova, D., Smola, J., 2007. The levels of PCV2 specific antibodies and viremia in pigs. Res Vet Sci 83, 274–278. doi:10.1016/j.rvsc.2006.11.013

Carman, S., Cai, H.Y., DeLay, J., Youssef, S.A., McEwen, B.J., Gagnon, C.A., Tremblay, D., Hazlett, M., Lusis, P., Fairles, J., Alexander, H.S., van Dreumel, T., 2008. The emergence of a new strain of porcine circovirus-2 in Ontario and Quebec swine and its association with severe porcine circovirus associated disease - 2004-2006. Can J Vet Res 72, 259–268.

Casal, J., De Manuel, A., Mateu, E., Martín, M., 2007. Biosecurity measures on swine farms in Spain: Perceptions by farmers and their relationship to current on-farm measures. Prev Vet Med 82, 138–150. doi:10.1016/j.prevetmed.2007.05.012

Caspari, K., Henning, H., Schreiber, F., Maass, P., Gössl, R., Schaller, C., Waberski, D., 2014. Impact of porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination on boar semen quality and quantity using two different vaccines. Theriogenology 82, 574–579. doi:10.1016/j.theriogenology.2014.05.017

Chae, C., 2015. An emerging porcine circovirus type 2b mutant (mPCV2b) originally known as PCV2d. Vet J 203, 6–9. doi:10.1016/j.tvjl.2014.11.003

Chae, C., 2012a. Commercial porcine circovirus type 2 vaccines: Efficacy and clinical application. Vet J 194, 151–157. doi:10.1016/j.tvjl.2012.06.031

Chae, C., 2012b. Porcine circovirus type 2 and its associated diseases in Korea. Virus Res 164, 107–113. doi:10.1016/j.virusres.2011.10.013

Chae, C., 2005. A review of porcine circovirus 2-associated syndromes and diseases. Vet J 169, 326–336. doi:10.1016/j.tvjl.2004.01.012

Chapin, A., Rule, A., Gibson, K., Buckley, T., Schwab, K., 2005. Airborne Multidrug-Resistant Bacteria Isolated from a Concentrated Swine Feeding Operation.

Environ Health Perspect 113, 137–142. doi:10.1289/ehp.7473

Chianini, F., Majó, N., Segalés, J., Domínguez, J., Domingo, M., 2003. Immunohistochemical characterisation of PCV2 associate lesions in lymphoid and non-lymphoid tissues of pigs with natural postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). Vet Immunol Immunopathol 94, 63–75. doi:10.1016/S0165-2427(03)00079-5

Chongsuvivatwong, V., 2018. epiDisplay: Epidemiological Data Display Package.

Ciria, J., Asenjo, B., 1999. Producción porcina en múltiples fases, in: Buxadé, C. (Ed.), Producción Porcina: Aspectos Claves. Editorial Mundi-Prensa.

Cline, G., Wilt, V., Diaz, E., Edler, R., 2008. Efficacy of immunising pigs against porcine circovirus type 2 at three or six weeks of age. Vet Rec 163, 737–740.

Comisión Europea, 2007. A new Animal Health strategy for the European Union (2007–2013) where "Prevention is better than cure." Commun from Comm to Counc Eur Parlam Eur Econ Soc Comm Comm Reg.

Corrêa, A.M., Zlotowski, P., Neves de Barcellos, D.E., da Cruz, C., Driemeier, D., 2007. Brain lesions in pigs affected with postweaning multisystemic wasting syndrome. J Vet Diagn Invest 19, 109–112.

Corrégé, I., Pirouelle, H., Gaudré, D., Le Tiran, M.-H., 2001. La Maladie de l'Amaigrissement du Porcelet (MAP) Influence de différents paramètres zootechniques sur son incidence dans un élevage expérimental. Journées la Rech Porc 33, 283–290.

Cortey, M., Pileri, E., Sibila, M., Pujols, J., Balasch, M., Plana, J., Segalés, J., 2011a. Genotypic shift of porcine circovirus type 2 from PCV-2a to PCV-2b in Spain from 1985 to 2008. Vet J 187, 363–368. doi:10.1016/j.tvjl.2009.12.023

Cortey, M, Napp, S., Alba, A., Pileri, E., Grau-Roma, L., Sibila, M., Segalés, J., 2011b. Theoretical and experimental approaches to estimate the usefulness of pooled serum samples for the diagnosis of postweaning multisystemic wasting syndrome. J Vet Diagn Invest 23, 233–240. doi:10.1177/104063871102300206

Corzo, C.A., Allerson, M., Gramer, M., Morrison, R.B., Torremorell, M., 2014. Detection of Airborne Influenza A Virus in Experimentally Infected Pigs With Maternally Derived Antibodies. Transbound Emerg Dis 61, 28–36. doi:10.1111/j.1865-1682.2012.01367.x

Corzo, C.A., Culhane, M., Dee, S., Morrison, R.B., Torremorell, M., 2013a. Airborne Detection and Quantification of Swine Influenza A Virus in Air Samples Collected Inside, Outside and Downwind from Swine Barns. PLoS One 8. doi:10.1371/journal.pone.0071444

Corzo, C.A., Romagosa, A., Dee, S.A., Gramer, M.R., Morrison, R.B., Torremorell, M., 2013b. Relationship between airborne detection of influenza A virus and the number of infected pigs. Vet J 196, 171–175. doi:10.1016/j.tvjl.2012.09.024

Cowling, D.W., Gardner, I.A., Johnson, W.O., 1999. Comparison of methods for estimation of individual-level prevalence based on pooled samples. Prev Vet Med 39, 211–225. doi:10.1016/S0167-5877(98)00131-7

Crowther, R.A., Berriman, J.A., Curran, W.L., Allan, G.M., Todd, D., 2003. Comparison of the Structures of Three Circoviruses: Chicken Anemia Virus, Porcine Circovirus Type 2, and Beak and Feather Disease Virus. J Virol 77, 13036–13041. doi:10.1128/JVI.77.24.13036

Csagola, A., Cadar, D., Tuboly, T., 2008. Replication and transmission of porcine Circovirus Type 2 in mice. Acta Vet Hung 56, 421–427. doi:10.1556/AVet.56.2008.3.15

Csank, T., Tom, A., Bhide, I.N.A., Herich, R., Levkut, M., 2013. Dynamics of antibody response and viraemia following natural infection of porcine circovirus 2 (PCV-2) in a conventional pig herd. Acta Pathol Microbiol Immunol Scand 2, 1207–1213. doi:10.1111/apm.12069

da Silva, N., Carriquiry, A., O'Neill, K., Opriessnig, T., O'Connor, A.M., 2014. Mixed treatment comparison meta-analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccines used in piglets. Prev Vet Med 117, 413–424. doi:10.1016/j.prevetmed.2014.10.006

Damte, D., Yohanes, S.B., Hossain, M.A., Lee, S.J., Rhee, M.H., Kim, Y.H., Park, S.C., 2014. Detection of naturally aerosolized *Mycoplasma hyopneumoniae* from the air of selected swine farms. Aerobiologia (Bologna) 30, 205–209. doi:10.1007/s10453-013-9315-1

Darwich, L., Segalés, J., Domingo, M., Mateu, E., 2002. Changes in CD4+, CD8+, CD4+ CD8+, and Immunoglobulin M-Positive Peripheral Blood Mononuclear Cells of Postweaning

Multisystemic Wasting Syndrome-Affected Pigs and Age-Matched Uninfected Wasted and Healthy Pigs Correlate with Lesions and Porcine Circovirus. Clin Diagn Lab Immunol 9, 236–242. doi:10.1128/CDLI.9.2.236–242.2002

Davies, B., Wang, X., Dvorak, C.M.T., Marthaler, D., Murtaugh, M.P., 2016. Diagnostic phylogenetics reveals a new Porcine circovirus 2 cluster. Virus Res 217, 32–37. doi:10.1016/j.virusres.2016.02.010

de Castro, A.M.M.G., Brombila, T., Bersano, J.G., Soares, H.S., de Souza Silva, S.O., Minervino, A.H.H., Ogata, R.A., Gennari, S.M., Richtzenhain, L.J., 2014. Swine infectious agents in Tayassu pecari and pecari tajacu tissue samples from Brazil. J Wildl Dis 50, 205–209. doi:10.7589/2013-01-021

De Evgrafov, M.R., Kõll, P., Frank, D.N., Baumgartner, L.K., Robertson, C.E., Hernández, M.T., Pace, N.R., 2013. Molecular analysis of bacterial and circovirus bioaerosols in concentrated animal feeding operations. Aerosol Sci Technol 47, 755–766. doi:10.1080/02786826.2013.789477

Dee, S., Otake, S., Deen, J., 2010. Use of a production region model to assess the efficacy of various air filtration systems for preventing airborne transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and *Mycoplasma hyopneumoniae*: Results from a 2-year study. Virus Res 154, 177–184. doi:10.1016/j.virusres.2010.07.022

Dee, S., Otake, S., Oliveira, S., Deen, J., 2009. Evidence of long distance airborne transport of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and *Mycoplasma hyopneumoniae*. Vet Rec 40. doi:10.1051/vetres/2009022

Dee, S.A., Deen, J., Cano, J.P., Batista, L., Pijoan, C., 2006. Further evaluation of alternative air-filtration systems for reducing the transmission of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus by aerosol. Can J Vet Res 70, 168–175.

Dee, S.A., Deen, J., Otake, S., Pijoan, C., 2004. An experimental model to evaluate the role of transport vehicles as a source of transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus to susceptible pigs. Can J Vet Res 68, 128–133.

Dee, S., Deen, J., Rossow, K., Wiese, C., Otake, S., Joo, H.S., Pijoan, C., 2002. Mechanical transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus throughout a coordinated sequence of events during cold weather. Can J Vet Res 66, 232–239.

Dee, S.A., Corey, M.M., 1993. The survival of *Streptococcus suis* on farm and veterinary equipment. J Swine Health Prod 1, 17–20.

Desrosiers, R., 2011. Transmission of swine pathogens: different means, different needs. Anim Health Res Rev 12, 1–13. doi:10.1017/S1466252310000204

Dewey, C.E., Johnston, W.T., Gould, L., Whiting, T.L., 2006. Postweaning mortality in Manitoba swine. Can J Vet Res 70, 161–167.

Dewulf, J., Koenen, F., Ribbens, S., Haegeman, A., Laevens, H., De Kruif, A., 2005. Evaluation of the epidemiological importance of classical swine fever infected, E2 sub-unit marker vaccinated animals with RT-nPCR positive blood samples. J Vet Med Ser B Infect Dis Vet Public Heal 52, 367–371. doi:10.1111/j.1439-0450.2005.00884.x

Dhindwal, S., Avila, B., Feng, S., Khayat, R., 2019. Porcine Circovirus 2 Uses a Multitude of Weak Binding Sites To Interact with Heparan Sulfate, and the Interactions Do Not Follow the Symmetry of the Capsid. J Virol 93, 1–16. doi:10.1128/jvi.02222-18

Dieste-Pérez, L., van Nes, A., van Maanen, K., Duinhof, T., Tobias, T., 2018. The prevalence of PCV2 viremia in newborn piglets on four endemically infected Dutch sow farms is very low. Prev Vet Med 153, 42–46. doi:10.1016/j.prevetmed.2018.03.001

Donham, K.J., Scallon, L.J., Popendorf, W., Treuhaft, M.W., Roberts, R.C., 1986. Characterization of Dusts Collected from Swine Confinement Buildings. Am Ind Hyg Assoc J 47, 404–410.

Dorr, P.M., Baker, R.., Almond, G.W., Wayne, S., Gebreyes, W.A., 2007. Epidemiologic assessment of porcine circovirus type 2 coinfection with other pathogens in swine. J Am Vet Med Assoc 230, 244–250. doi:https://doi.org/10.2460/javma.230.2.244

Drolet, R., Thibault, S., D'Allaire, S., Thomson, J.R., Done, S.H., 1999. Porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS): An overview of the disease. Swine Heal Prod 7, 283–285.

Dupont, K., Hjulsager, C.K., Kristensen, C.S., Baekbo, P., Larsen, L.E., 2009. Transmission of different variants of PCV2 and viral dynamics in a research facility with pigs mingled from PMWS-affected herds and non-

affected herds. Vet Microbiol 139, 219–226. doi:10.1016/j.vetmic.2009.06.001

Dupont, K., Nielsen, E.O., Bækbo, P., Larsen, L.E., 2008. Genomic analysis of PCV2 isolates from Danish archives and a current PMWS case-control study supports a shift in genotypes with time. Vet Microbiol 128, 56–64. doi:10.1016/j.vetmic.2007.09.016

Dvorak, C.M.T., Payne, B.J., Seate, J.L., Murtaugh, M.P., 2018. Effect of Maternal Antibody Transfer on Antibody Dynamics and Control of Porcine Circovirus Type 2 Infection in Offspring. Viral Immunol 31, 40–46. doi:10.1089/vim.2017.0058

Dvorak, C.M.T., Yang, Y., Haley, C., Sharma, N., Murtaugh, M.P., 2016. National reduction in porcine circovirus type 2 prevalence following introduction of vaccination. Vet Microbiol 189, 86–90. doi:10.1016/j.vetmic.2016.05.002

Dvorak, C.M.T., Lilla, M.P., Baker, S.R., Murtaugh, M.P., 2013. Multiple routes of porcine circovirus type 2 transmission to piglets in the presence of maternal immunity. Vet Microbiol 166, 365–374. doi:10.1016/j.vetmic.2013.06.011

Eddicks, M., Beuter, B., Stuhldreier, R., Nolte, T., Reese, S., Sutter, G., Ritzmann, M., Fux, R., 2018. Cross-sectional study on viraemia and shedding of porcine circovirus type 2 in a subclinically infected multiplier sow herd. Vet Rec 1–6. doi:10.1136/vr.105069

Eddicks, M., Koeppen, M., Willi, S., Fux, R., Reese, S., Sutter, G., Stadler, J., Ritzmann, M., 2016. Low prevalence of porcine circovirus type 2 infections in farrowing sows and corresponding pre-suckling piglets in southern German pig farms. Vet Microbiol 187, 70–74. doi:10.1016/j.vetmic.2016.03.010

Eddicks, M., Fux, R., Szikora, F., Eddicks, L., Majzoub-altweck, M., Hermanns, W., Sutter, G., Palzer, A., Banholzer, E., Ritzmann, M., 2015. Detection of a new cluster of porcine circovirus type 2b strains in domestic pigs in Germany. Vet Microbiol 176, 337–343. doi:10.1016/j.vetmic.2015.01.013

Elliott, L.F., Mccalla, T.M., Deshazer, J.A., 1976. Bacteria in the Air of Housed Swine Units '. Appl Environ Microbiol 270–273.

Ellis-Iversen, J., Ridley, A., Morris, V., Sowa, A., Harris, J., Atterbury, R., Sparks, N., Allen, V., 2012. Persistent environmental reservoirs on farms as risk factors for *Campylobacter* in commercial poultry. Epidemiol Infect 140, 916–924. doi:10.1017/S095026881100118X

Ellis, J., Clark, E., Haines, D., West, K., Krakowka, S., Kennedy, S., Allan, G.M., 2004. Porcine circovirus-2 and concurrent infection in the field. Vet Microbiol 98, 159–163.

Ellis, J., Konoby, C., West, K.H., Allan, G.M., Krakowka, S., Mcneilly, F., Meehan, B., Walker, I., 2001. Lack of antibodies to porcine circovirus type 2 virus in beef and dairy cattle and horses in western Canada. Can Vet J 461–464.

Ellis, J.A., Wiseman, B.M., Allan, G., Konoby, C., Krakowka, S., Meehan, B.M., Mcneilly, F., 2000a. Analysis of seroconversion to porcine circovirus 2 among veterinarians from the United States and Canada. Public Vet Med Public Heal 217, 1645–1646.

Ellis, J., Bratanich, A., Clark, E.G., Allan, G., Meehan, B., Haines, D.M., Harding, J., West, K.H., Krakowka, S., Konoby, C., Hassard, L., Martin, K., McNeilly, F., 2000b. Coinfection by porcine circoviruses and porcine parvovirus in pigs with naturally acquired postweaning multisystemic wasting syndrome. J Vet Diagn Invest 12, 21–27. doi:10.1177/104063870001200104

Espinosa-Gongora, C., Larsen, J., Moodley, A., Nielsen, J.P., Skov, R.L., Andreasen, M., Guardabassi, L., 2012. Farm-specific lineages of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clonal complex 398 in Danish pig farms. Epidemiol Infect 140, 1794–1799. doi:10.1017/S0950268811002391

Fachinger, V., Bischoff, R., Jedidia, S. Ben, Saalmüller, A., Elbers, K., 2008. The effect of vaccination against porcine circovirus type 2 in pigs suffering from porcine respiratory disease complex. Vaccine 26, 1488–1499. doi:10.1016/j.vaccine.2007.11.053

Fenaux, M., Opriessnig, T., Halbur, P.G., Elvinger, F., Meng, X.J., 2004a. Two Amino Acid Mutations in the Capsid Protein of Type 2 Porcine Circovirus (PCV2) Enhanced PCV2 Replication In Vitro and Attenuated the Virus In Vivo. J Virol 78, 13440–13446. doi:10.1128/jvi.78.24.13440-13446.2004

Fenaux, M, Opriessnig, T., Halbur, P.G., Elvinger, F., Meng, X.J., 2004b. A chimeric porcine circovirus (PCV) with the immunogenic capsid gene of the pathogenic PCV type 2 (PCV2) cloned into the genomic backbone of the nonpathogenic PCV1 induces protective immunity against PCV2 infection in pigs. J Virol 78, 6297–303.

doi:10.1128/JVI.78.12.6297-6303.2004

Feng, H., Segalés, J., Fraile, L., López-Soria, S., Sibila, M., 2016. Effect of high and low levels of maternally derived antibodies on porcine circovirus type 2 (PCV2) infection dynamics and production parameters in PCV2 vaccinated pigs under field conditions. Vaccine 34, 3044–3050. doi:10.1016/j.vaccine.2016.04.088

Feng, H., Blanco, G., Segalés, J., Sibila, M., 2014. Can Porcine circovirus type 2 (PCV2) infection be eradicated by mass vaccination? Vet Microbiol 172, 92–99. doi:10.1016/j.vetmic.2014.05.003

Ferguson, D., Smith, T., Hanson, B., Wardyn, S., Donham, K., 2016. Detection of Airborne MRSA Inside and Downwind of a Swine Building, and in Animal Feed: Potential Occupational, Animal Health, and Environmental Implications. J Agromedicine 21, 149–153. doi:10.1080/1059924X.2016.1142917

Ferrari, L., Borghetti, P., Angelis, E. De, Martelli, P., 2014. Memory T cell proliferative responses and IFN-γ productivity sustain long-lasting efficacy of a Cap-based PCV2 vaccine upon PCV2 natural infection and associated disease. Vet Res 45, 1–16. doi:10.1186/1297-9716-45-44

Ficha técnica CircoVac. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/circovac-epar-product-information_es.pdf

Ficha técnica IngelVac CircoFlex. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/ingelvac-circoflex-epar-product-information_es.pdf

Ficha técnica Myosphere PCV. https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2020/20200918148927/anx_148927_es.pdf

Ficha técnica Porcilis PCV. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/porcilis-pcv-epar-product-information_es.pdf

Ficha técnica Suvaxyn PCV. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/suvaxyn-pcv-epar-product-information_es.pdf

Ficha técnica Suvaxyn Circo. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/suvaxyn-circo-epar-product-information_es.pdf

Figueras, S., Hernández, I., Rodríguez, V., Díaz, E., 2016. El PCV2 y su cambio epidemiológico. PorciNews 1–7.

Filippitzi, M.E., Kruse, A.B., Postma, M., Sarrazin, S., Maes, D., Alban, L., Nielsen, L.R., Dewulf, J., 2018. Review of transmission routes of 24 infectious diseases preventable by biosecurity measures and comparison of the implementation of these measures in pig herds in six European countries. Transbound Emerg Dis 65, 381–398. doi:10.1111/tbed.12758

Finsterbusch, T., Mankertz, A., 2009. Porcine circoviruses — Small but powerful. Virus Res 143, 177–183. doi:10.1016/j.virusres.2009.02.009

Ford, W.B., 1995. Disinfection procedures for personnel and vehicles entering and leaving contaminated premises. Rev Sci Tech 14, 393–401. doi:10.20506/rst.14.2.847

Fort, M., Sibila, M., Nofrarías, M., Pérez-Martín, E., Olvera, A., Mateu, E., Segalés, J., 2010. Porcine circovirus type 2 (PCV2) Cap and Rep proteins are involved in the development of cell-mediated immunity upon PCV2 infection. Vet Immunol Immunopathol 137, 226–234. doi:10.1016/j.vetimm.2010.05.013

Fort, M., Fernandes, L.T., Nofrarias, M., Díaz, I., Sibila, M., Pujols, J., Mateu, E., Segalés, J., 2009a. Development of cell-mediated immunity to porcine circovirus type 2 (PCV2) in caesarean-derived, colostrum-deprived piglets. Vet Immunol Immunopathol 129, 101–107. doi:10.1016/j.vetimm.2008.12.024

Fort, M., Sibila, M., Pérez-Martín, E., Nofrarías, M., Mateu, E., Segalés, J., 2009b. One dose of a porcine circovirus 2 (PCV2) sub-unit vaccine administered to 3-week-old conventional piglets elicits cell-mediated immunity and significantly reduces PCV2 viremia in an experimental model. Vaccine 27, 4031–4037. doi:10.1016/j.vaccine.2009.04.028

Fort, M., Sibila, M., Allepuz, A., Mateu, E., Roerink, F., Segalés, J., 2008. Porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination of conventional pigs prevents viremia against PCV2 isolates of different genotypes and geographic origins. Vaccine 26, 1063–1071. doi:10.1016/j.vaccine.2007.12.019

Fort, M., Olvera, A., Sibila, M., Segalés, J., Mateu, E., 2007. Detection of neutralizing antibodies in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)-affected and non-PMWS-affected pigs. Vet Microbiol 125, 244–255. doi:10.1016/j.vetmic.2007.06.004

Fraile, L., Segalés, J., Ticó, G., López-soria, S., Valero, O., Nofrarías, M., Huerta, E., Llorens, A., López-Jiménez, R., Pérez, D., Sibila, M., 2015. Virological and serological characterization of vaccinated and non-vaccinated piglet subpopulations coming from vaccinated and non-vaccinated sows. Prev Vet Med 119, 153–161. doi:10.1016/j.prevetmed.2015.02.017

Fraile, L., Sarasola, P., Sinovas, N., Nofrarías, M., López-Jiménez, R., López-Soria, S., Sibila, M., Segalés, J., 2012a. Inactivated PCV2 one shot vaccine applied in 3-week-old piglets: Improvement of production parameters and interaction with maternally derived immunity. Vaccine 30, 1986–1992. doi:10.1016/j.vaccine.2012.01.008

Fraile, L., Sibila, M., Nofrarías, M., López-Jimenez, R., Huerta, E., Llorens, A., López-Soria, S., Pérez, D., Segalés, J., 2012b. Effect of sow and piglet porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination on piglet mortality, viraemia, antibody titre and production parameters. Vet Microbiol 161, 229–234. doi:10.1016/j.vetmic.2012.07.021

Franzo, G., Ruiz, A., Grassi, L., Sibila, M., Drigo, M., Segalés, J., 2020. Lack of Porcine circovirus 4 Genome Detection in Pig Samples from Italy and Spain. Pathogens 4–9. doi:10.3390/pathogens9060433

Franzo, G., Segalés, J., 2018. Porcine circovirus 2 (PCV-2) genotype update and proposal of a new genotyping methodology. PLoS One 13, 1–12. doi:10.1371/journal.pone.0208585

Franzo, G., Legnardi, M., Hjulsager, C.K., Klaumann, F., Larsen, L.E., Segalés, J., Drigo, M., 2018. Full-genome sequencing of porcine circovirus 3 field strains from Denmark, Italy and Spain demonstrates a high within- Europe genetic heterogeneity. Transbound Emerg Dis 3, 1–5. doi:10.1111/tbed.12836

Franzo, G., Cortey, M., Segalés, J., Hughes, J., Drigo, M., 2016a. Phylodynamic analysis of porcine circovirus type 2 reveals global waves of emerging genotypes and the circulation of recombinant forms. Mol Phylogenet Evol 100, 269–280. doi:10.1016/j.ympev.2016.04.028

Franzo, G., Tucciarone, C.M., Cecchinato, M., Drigo, M., 2016b. Porcine circovirus type 2 (PCV2) evolution before and after the vaccination introduction: A large scale epidemiological study. Sci Rep 6, 39458. doi:10.1038/srep39458

Franzo, G., Cortey, M., Olvera, A., Novosel, D., De Castro, A.M.M.G., Biagini, P., Segalés, J., Drigo, M., 2015a. Revisiting the taxonomical classification of Porcine Circovirus type 2 (PCV2): Still a real challenge. Virol J 12, 1–8. doi:10.1186/s12985-015-0361-x

Franzo, G., Cortey, M., Castro, A.M.M.G. de, Piovezan, U., Szabo, M.P.J., Drigo, M., Segalés, J., Richtzenhain, L.J., 2015b. Genetic characterisation of Porcine circovirus type 2 (PCV2) strains from feral pigs in the Brazilian Pantanal: An opportunity to reconstruct the history of PCV2 evolution. Vet Microbiol 178, 158–162. doi:10.1016/j.vetmic.2015.05.003

Friese, A., Schulz, J., Hoehle, L., Fetsch, A., Tenhagen, B.A., Hartung, J., Roesler, U., 2012. Occurrence of MRSA in air and housing environment of pig barns. Vet Microbiol 158, 129–135. doi:10.1016/j.vetmic.2012.01.019

Gagnon, C.A., Tremblay, D., Tijssen, P., Venne, M.H., Houde, A., Elahi, S.M., 2007. The emergence of porcine circovirus 2b genotype (PCV-2b) in swine in Canada. Can Vet J 48, 811–819.

Gao, Z., Dong, Q., Jiang, Y., Opriessnig, T., Wang, J., Quan, Y., Yang, Z., 2014. ORF4-protein deficient PCV2 mutants enhance virus-induced apoptosis and show differential expression of mRNAs in vitro. Virus Res 183, 56–62. doi:10.1016/j.virusres.2014.01.024

Garrido-Mantilla, J., Alvarez, J., Culhane, M., Nirmala, J., Cano, J.P., Torremorell, M., 2019. Comparison of individual, group and environmental sampling strategies to conduct influenza surveillance in pigs. BMC Vet Res 15, 1–10. doi:10.1186/s12917-019-1805-0

Gerber, P.F., Garrocho, F.M., Lana, Â.M.Q., Lobato, Z.I.P., 2011. Serum antibodies and shedding of infectious porcine circovirus 2 into colostrum and milk of vaccinated and unvaccinated naturally infected sows. Vet J 188, 240–242. doi:10.1016/j.tvjl.2010.03.023

Giacomini, E., Gasparrini, S., Lazzaro, M., Scali, F., Boniotti, M.B., Corradi, A., Pasquali, P., Alborali, G.L., 2018. The role of transportation in the spread of *Brachyspira hyodysenteriae* in fattening farms. BMC Vet Res 14, 1–6. doi:10.1186/s12917-017-1328-5

Gillespie, J., Opriessnig, T., Meng, X.J., Pelzer, K., Buechner-Maxxwell, V., 2009. Porcine Circovirus Type 2 and Porcine Circovirus - Associated Disease. J Vet Med 23, 1151–1163. doi:10.1111/j.1939-1676.2009.0389.x

Gottschalk, M., Broes, A., 2019. Actinobacillosis, in: Zimmerman, J.J., Karriker, L.A., Ramirez, A., Schwartz, K.J., Stevenson, G.W., Zhang, J. (Eds.), Diseases of Swine. Wiley-Blackwell, 11th edition, pp. 749–766.

Grau-Roma, L., Fraile, L., Segalés, J., 2011. Recent advances in the epidemiology, diagnosis and control of diseases caused by porcine circovirus type 2. Vet J 187, 23–32. doi:10.1016/j.tvjl.2010.01.018

Grau-Roma, L., Hjulsager, C.K., Sibila, M., Kristensen, C.S., López-Soria, S., Enøe, C., Casal, J., Bøtner, A., Nofrarías, M., Bille-hansen, V., Fraile, L., Baekbo, P., Segalés, J., Larsen, L.E., 2009. Infection, excretion and seroconversion dynamics of porcine circovirus type 2 (PCV2) in pigs from post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) affected farms in Spain and Denmark. Vet Microbiol 135, 272–282. doi:10.1016/j.vetmic.2008.10.007

Grau-Roma, L., Crisci, E., Sibila, M., López-Soria, S., Nofrarias, M., Cortey, M., Fraile, L., Olvera, A., Segalés, J., 2008. A proposal on porcine circovirus type 2 (PCV2) genotype definition and their relation with postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) occurrence. Vet Microbiol 128, 23–35. doi:10.1016/j.vetmic.2007.09.007

Grau-Roma, L., Segalés, J., 2007. Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, porcine circovirus type 2, swine influenza virus and Aujeszky's disease virus in cases of porcine proliferative and necrotizing pneumonia (PNP) in Spain. Vet Microbiol 119, 144–151. doi:10.1016/j.vetmic.2006.09.009

Guo, L., Fu, Y., Wang, Y., Lu, Y., Wei, Y., Tang, Q., Fan, P., Liu, J., Zhang, L., Zhang, F., Huang, L., Liu, D., Li, S., Wu, H., Liu, C., 2012. A porcine circovirus type 2 (PCV2) mutant with 234 amino acids in Capsid protein showed more virulence in vivo, compared with classical PCV2a/b strain. PLoS One 7. doi:10.1371/journal.pone.0041463

Ha, Y., Ahn, K.K., Kim, B., Cho, K.D., Lee, B.H., Oh, Y.S., Kim, S.H., Chae, C., 2009. Evidence of shedding of porcine circovirus type 2 in milk from experimentally infected sows. Res Vet Sci 86, 108–110. doi:10.1016/j.rvsc.2008.04.004

Haake, M., Palzer, A., Rist, B., Weissenbacher-Lang, C., Fachinger, V., Eggen, A., Ritzmann, M., Eddicks, M., 2014. Influence of age on the effectiveness of PCV2 vaccination in piglets with high levels of maternally derived antibodies. Vet Microbiol 168, 272–280. doi:10.1016/j.vetmic.2013.11.012

Halami, M.Y., Freick, M., Shehata, A.A., Müller, H., Vahlenkamp, T.W., 2014. Susceptibility of calves to porcine circovirus-2 (PCV2). Vet Microbiol 173, 125–131. doi:10.1016/j.vetmic.2014.06.022

Hamel, A.L., Lin, L.L., Nayar, G.P.S., 1998. Nucleotide Sequence of Porcine Circovirus Associated with Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome in Pigs 72, 5262–5267.

Harding, J.C.S., Ellis, J.A., Mcintosh, K.A., Krakowka, S., 2010. Dual heterologous porcine circovirus genogroup 2a/2b infection induces severe disease in germ-free pigs. Vet Microbiol 145, 209–219. doi:10.1016/j.vetmic.2010.03.026

Harding, J.C.S., 2004. The clinical expression and emergence of porcine circovirus 2. Vet Microbiol 98, 131–135. doi:10.1016/j.vetmic.2003.10.013

Harding, J.C.S., Clark, E.T.G., Strokappe, J.H., Willson, P.I., Ellis, J. a, 1998. Postweaning multisystemic wasting syndrome: Epidemiology and clinical presentation. Swine Heal Prod 6, 249–254.

Harding, J.S., Clark, E.G., 1997. Recognizing and diagnosing postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). Swine Heal Prod 5, 201–203.

Harris, D.L., 1988. Alternative approaches to eliminating disease and improving performance of pigs. Vet Rec 422–423. doi:10.1136/vr.123.16.422

Hemann, M., Beach, N.M., Meng, X.J., Wang, C., Halbur, P.G., Opriessnig, T., 2014. A live-attenuated and an inactivated chimeric porcine circovirus (PCV)1-2 vaccine are both effective at inducing a humoral immune response and reducing PCV2 viremia and intrauterine infection in female swine of breeding age. Can J Vet Res 78, 8–16.

Hémonic, A., Corrégé, I., Lanneshoa, M., 2010. Quelles sont les pratiques de biosécurité et d'hygiène en élevages de porcs? TechniPorc 33, 7–13.

Henao-Diaz, A., Giménez-Lirola, L., Baum, D.H., Zimmerman, J., 2020. Guidelines for oral fluid-based surveillance of viral pathogens in swine. Porc Heal Manag 6, 1–12. doi:10.1186/s40813-020-00168-w

Hermann, J.R., Brockmeier, S.L., Yoon, K.,

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Zimmerman, J.J., 2008. Detection of respiratory pathogens in air samples from acutely infected pigs. Can J Vet Res 367–370.

Herranz, A., 2020. Presentación de la Interprofesional del Porcino de la Capa Blanca (Interporc), in: Agrifood Revolution: Alimentación y Medio Ambiente. Por Un Planeta Más Verde.

Hesse, R., Kerrigan, M., Rowland, R.R.R., 2008. Evidence for recombination between PCV2a and PCV2b in the field. Virus Res 132, 201–207. doi:10.1016/j.virusres.2007.10.013

Holtkamp, D., Polson, D., Torremorell, M., Morrison, B., Classen, D.M., Becton, L., Henry, S., Rodibaugh, M.T., Rowland, R.R., Snelson, H., Straw, B., Yeske, P., Zimmerman, J., 2011. Terminology for Classifying Swine Herds by PRRS Status. J Swine Health Prod 19, 44–56.

Hoogland, M.J., Opriessnig, T., Halbur, P.G., 2006. Effects of adjuvants on porcine circovirus type 2-associated lesions. J Swine Health Prod 14, 133–139.

Horlen, K.P., Dritz, S.S., Nierfeld, J.C., Henry, S.C., Hesse, R.A., Oberst, R., Hays, M., Anderson, J., Rowland, R.R.R., 2008. A field evaluation of mortality rate and growth performance in pigs vaccinated against porcine circovirus type 2. J Am Vet Med Assoc 232, 906–912.

Jensen, A.N., Dalsgaard, A., Baggesen, D.L., Nielsen, E.M., 2006. The occurrence and characterization of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* in organic pigs and their outdoor environment. Vet Microbiol 116, 96–105. doi:10.1016/j.vetmic.2006.03.006

Jeong, J., Park, C., Choi, K., Chae, C., 2015. Comparison of three commercial one-dose porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccines in a herd with concurrent circulation of PCV2b and mutant PCV2b. Vet Microbiol 177, 43–52. doi:10.1016/j.vetmic.2015.02.027

Johnson, C.S., Joo, H.S., Direksin, K., Yoon, K., Choi, Y.K., 2002. Experimental in utero inoculation of late-term swine fetuses with porcine circovirus type 2. J Vet Diagn Invest 14, 507–512.

Johnstone, A.C., Lawton, D.E.B., 2008. Porcine dermatitis and nephropathy syndrome in New Zealand. N Z Vet J 56, 94–99. doi:10.1080/00480169.2008.36816

Jung, K., Kim, J., Ha, Y., Choi, C., Chae, C., 2006. The effects of transplacental porcine circovirus type 2 infection on porcine epidemic diarrhoea virus-induced enteri- tis in preweaning piglets. Vet J 171, 445–450.

Kaalberg, L., Geurts, V., Jolie, R., 2017. A field efficacy and safety trial in the Netherlands in pigs vaccinated at 3 weeks of age with a ready-to-use porcine circovirus type 2 and *Mycoplasma hyopneumoniae* combined vaccine. Porc Heal Manag 3, 2–8. doi:10.1186/s40813-017-0070-5

Kawashima, K., Tsunemitsu, H., Horino, R., Katsuda, K., Onodera, T., Shoji, T., Kubo, M., Haritani, M., Murakami, Y., 2003. Effects of dexamethasone on the pathogenesis of porcine circovirus type 2 infection in piglets. J Comp Pathol 129, 294–302. doi:10.1016/S0021-9975(03)00047-1

Kekarainen, T., McCullough, K., Fort, M., Fossum, C., Segalés, J., Allan, G.M., 2010. Immune responses and vaccine-induced immunity against Porcine circovirus type 2. Vet Immunol Immunopathol 136, 185–193. doi:10.1016/j.vetimm.2010.03.025

Kekarainen, T., Sibila, M., Segalés, J., 2006. Prevalence of swine *Torque teno virus* in post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)-affected and non-PMWS-affected pigs in. J Gen Virol 87, 833–837. doi:10.1099/vir.0.81586-0

Kim, D., Kim, C.H., Han, K., Seo, H.W., Oh, Y., Park, C., Kang, I., Chae, C., 2011. Comparative efficacy of commercial *Mycoplasma hyopneumoniae* and porcine circovirus 2 (PCV2) vaccines in pigs experimentally infected with *M. hyopneumoniae* and PCV2. Vaccine 29, 3206–3212. doi:10.1016/j.vaccine.2011.02.034

Kim, H.B., Lyoo, K.S., Joo, H.S., 2009. Disinfectants in vitro against porcine circovirus type 2. Vet Rec 164, 599–600.

Kim, J., Ha, Y., Jung, K., Choi, C., Chae, C., 2004. Enteritis associated with porcine circovirus 2 in pigs 218–221.

Kim, J., Chung, H., Jung, T., Cho, W., Choi, C., Chae, C., 2002. Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome of Pigs in Korea: Prevalence, Microscopic Lesions and Coexisting Microorganisms. J Vet Med Sci 64, 57–62.

Kim, K.Y., Ko, H.J., Kim, H.T., Kim, C.N., Kim, Y.S., 2008. Assessment of airborne bacteria and fungi in pig buildings in Korea. Biosyst Eng 99, 565–572. doi:10.1016/j.biosystemseng.2007.12.006

Kim, S., Nazki, S., Kwon, S., Juhng, J., Mun, K., Jeon, D., Jeong, C., Khatun, A., Kang, S., Kim, W., 2018. The prevalence and genetic characteristics of porcine circovirus type 2 and 3 in Korea. BMC Vet Res 1–9.

Kim, Y., Yang, M., Goyal, S.M., Cheeran, M.C.J., Torremorell, M., 2017. Evaluation of biosecurity measures to prevent indirect transmission of porcine epidemic diarrhea virus. BMC Vet Res 13. doi:10.1186/s12917-017-1017-4

King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B., Lefkowitz, E.J. (Eds.), 2012. Virus Taxonomy, 9th ed. Elsevier.

Kixmöller, M., Ritzmann, M., Eddicks, M., Saalm, A., Elbers, K., Fachinger, V., 2008. Reduction of PMWS-associated clinical signs and co-infections by vaccination against PCV2. Vaccine 26, 3443–3451. doi:10.1016/j.vaccine.2008.04.032

Klaumann, F., Correa-fiz, F., Sibila, M., Núñez, J.I., Segalés, J., 2019. Infection dynamics of porcine circovirus type 3 in longitudinally sampled pigs from four Spanish farms. Vet Rec 184. doi:10.1136/vr.105219

Klaumann, F., Correa-fiz, F., Franzo, G., Sibila, M., Núñez, J.I., Segalés, J., 2018. Current Knowledge on Porcine circovirus 3 (PCV-3): A Novel Virus With a Yet Unknown Impact on the Swine Industry. Front Vet Sci 5, 1–13. doi:10.3389/fvets.2018.00315

Koinig, H.C., Talker, S.C., Stadler, M., Ladinig, A., Graage, R., Ritzmann, M., Hennig-Pauka, I., Gerner, W., Saalmüller, A., 2015. PCV2 vaccination induces IFN-γ/TNF-α co-producing T cells with a potential role in protection. Vet Res 46, 1–13. doi:10.1186/s13567-015-0157-4

Krakowka, S., Ellis, J.A., McNeilly, F., Ringler, S., Rings, D.M., Allan, G., 2001. Activation of the immune system is the pivotal event in the production of wasting disease in pigs infected with porcine circovirus-2 (PCV-2). Vet Pathol 38, 31–42. doi:10.1354/vp.38-1-31

Kristensen, C.S., Hjulsager, C.K., Vestergaard, K., Dupont, K., Bille-Hansen, V., Enøe, C., Jorsal, S.E., Bækbo, P., Larsen, L.E., 2013. Experimental airborne transmission of porcine postweaning multisystemic wasting syndrome. J Pathog 2013, 534342. doi:10.1155/2013/534342

Kristensen, C.S., Baekbo, P., Bille-Hansen, V., Bøtner, A., Vigre, H., Enøe, C., Larsen, L.E., 2009. Induction of porcine post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs from PMWS unaffected herds following mingling with pigs from PMWS-affected herds. Vet Microbiol 138, 244–250. doi:10.1016/j.vetmic.2009.04.004

Ku, X., Chen, F., Li, P., Wang, Y., Yu, X., Fan, S., Quian, P., Wu, M., He, Q., 2017. Identification and genetic characterization of porcine circovirus type 3 in China. Transbound Emerg Dis 703–708. doi:10.1111/tbed.12638

Kurmann, J., Sydler, T., Brugnera, E., Buergi, E., Haessig, M., Suter, M., Sidler, X., 2011. Vaccination of dams increases antibody titer and improves growth parameters in finisher pigs subclinically infected with porcine circovirus type 2. Clin Vaccine Immunol 18, 1644–1649. doi:10.1128/CVI.05183-11

Kyriakis, S.C., Saoulidis, K., Lekkas, S., Miliotis, C.C., Papoutsis, P.A., Kennedy, S., 2002. The effects of immuno-modulation on the clinical and pathological expression of postweaning multisystemic wasting syndrome. J Comp Pathol 126, 38–46. doi:10.1053/jcpa.2001.0520

Lambert, M.-ève, Arsenault, J., Poljak, Z., D'Allaire, S., 2012. Epidemiological investigations in regard to porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) in Quebec, Canada. Part 2: Prevalence and risk factors in breeding sites. Prev Vet Med 104, 84–93. doi:10.1016/j.prevetmed.2011.11.002

Larochelle, R., Magar, R., D'Allaire, S., 2003. Comparative serologic and virologic study of commercial swine herds with and without postweaning multisystemic wasting syndrome. Can J Vet Res 67, 114–120.

Larochelle, R., Bielanski, A., Muller, P., Magar, R., 2000. PCR detection and evidence of shedding of porcine circovirus type 2 in boar semen. J Clin Microbiol 38, 4629–4632.

Li, D., Wang, J., Xu, S., Cai, S., Ao, C., Fang, L., Xiao, S., Chen, H., Jiang, Y., 2018. Identification and functional analysis of the novel ORF6 protein of porcine circovirus type 2 in vitro. Vet Res Commun 42, 1–10. doi:10.1007/s11259-017-9702-0

Li, H., Liang, R., Pang, Y., Shi, L., Cui, S., Lin, W., 2020. Evidence for interspecies transmission route of pseudorabies virus via virally contaminated fomites. Vet Microbiol 251, 108912. doi:10.1016/j.vetmic.2020.108912

Liu, J., Chen, I., Kwang, J., 2005. Characterization of a Previously Unidentified Viral Protein in Porcine Circovirus Type 2-Infected Cells and

Its Role in Virus-Induced Apoptosis. J Virol 79, 8262–8274. doi:10.1128/JVI.79.13.8262

López-Lorenzo, G., Díaz-Cao, J.M., Prieto, A., López-Novo, C., López, C.M., Díaz, P., Rodríguez-Vega, V., Díez-Baños, P., Fernández, G., 2019. Environmental distribution of Porcine Circovirus Type 2 (PCV2) in swine herds with natural infection. Sci Rep 9, 1–8. doi:10.1038/s41598-019-51473-6

López-Lorenzo, G., López-Novo, C., Prieto, A., Díaz, J.M., Gullón, J., Arnal, J.L., Benito, A., Díaz, P., Panadero, R., Díez-Baños, P., Dalton, K.P., Parra, F., Fernández, G., 2020. Molecular detection of myxoma virus in the environment of vaccinated rabbitries. Transbound Emerg Dis 1–8. doi:10.1111/tbed.13809

López-Lorenzo, G., López-Novo, C., Prieto, A., Díaz, P., Panadero, R., Rodríguez-Vega, V., Morrondo, P., Fernández, G., Díaz-Cao, J.M., 2021. Monitoring of porcine circovirus type 2 infection through air and surface samples in vaccinated and unvaccinated fattening farms. Transbound Emerg Dis 00, 1–10. doi:10.1111/tbed.14069

López-Soria, S., Sibila, M., Nofrarías, M., Calsamiglia, M., Manzanilla, E.G., Ramírez-Mendoza, H., Mínguez, A., Serrano, J.M., Marín, O., Joisel, F., Charreyre, C., Segalés, J., 2014. Effect of porcine circovirus type 2 (PCV2) load in serum on average daily weight gain during the postweaning period. Vet Microbiol 174, 296–301. doi:10.1016/j.vetmic.2014.09.016

López-Soria, S., Segalés, J., Rose, N., Viñas, M.J., Blanchard, P., Madec, F., Jestin, A., Casal, J., Domingo, M., 2005. An exploratory study on risk factors for postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in Spain. Prev Vet Med 69, 97–107. doi:10.1016/j.prevetmed.2004.11.015

López-Soria, S., Segalés, J., Nofrarias, M., Calsamiglia, M., Ramírez, H., Mínguez, A., Serrano, I.M., Marín, O., Callén, A., 2004. Genetic influence on the expression of PCV disease. Vet Rec 155, 504.

Lopez, W.A., Angulo, J., Zimmerman, J.J., L Linhares, D.C., 2018. Porcine reproductive and respiratory syndrome monitoring in breeding herds using processing fluids. J Swine Health Prod 26, 146–150.

Lörincz, M., Cságola, A., Biksi, I., Szeredi, L., Dán, Á., Tuboly, T., 2010. Detection of Porcine Circovirus in rodents - Short comunication. Acta Vet Hung 58, 265–268. doi:10.1556/AVet.58.2010.2.12

Lowe, J., Gauger, P., Harmon, K., Zhang, J., Connor, J., Yeske, P., Loula, T., Levis, I., Dufresne, L., Main, R., 2014. Role of transportation in spread of porcine epidemic diarrhea virus infection, United States. Emerg Infect Dis 20, 872–874. doi:10.3201/eid2005.131628 [doi]

Luyckx, K., Millet, S., Van Weyenberg, S., Herman, L., Heyndrickx, M., Dewulf, J., De Reu, K., 2016. A 10-day vacancy period after cleaning and disinfection has no effect on the bacterial load in pig nursery units. BMC Vet Res 12, 1–6. doi:10.1186/s12917-016-0850-1

Lyoo, K., Joo, H., Caldwell, B., Kim, H., Davies, P.R., Torrison, J., 2011. Comparative efficacy of three commercial PCV2 vaccines in conventionally reared pigs. Vet J 189, 58–62. doi:10.1016/j.tvjl.2010.06.015

Madec, F., Hurnik, D., Porphyre, V., Cardinale, E., 2010. Good practices for biosecurity in the pig sector - Issues and options in developing and transition countries, FAO Animal Production and Health Paper No. 169.

Madec, F., Rose, N., Grasland, B., Cariolet, R., Jestin, A., 2008. Post-weaning multisystemic wasting syndrome and other PCV2-related problems in pigs: A 12-year experience. Transbound Emerg Dis 55, 273–283. doi:10.1111/j.1865-1682.2008.01035.x

Madec, F., Eveno, E., Morvan, P., Hamon, L., Blanchard, P., Cariolet, R., Amenna, N., Morvan, H., Truong, C., Mahé, D., Albina, E., Jestin, A., 2000. Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs in France: clinical observations from follow-up studies on affected farms. Livest Prod Sci 63, 223–233. doi:10.1016/S0301-6226(99)00138-4

Madson, D.M., Opriessnig, T., 2011. Effect of porcine circovirus type 2 (PCV2) infection on reproduction: disease, vertical transmission, diagnostics and vaccination. Anim Health Res Rev 12, 47–65. doi:10.1017/S1466252311000053

Madson, D.M., Patterson, A.R., Ramamoorthy, S., Pal, N., Meng, X.J., Opriessnig, T., 2009a. Reproductive Failure Experimentally Induced in Sows via Artificial Insemination with Semen Spiked with Porcine Circovirus Type 2. Vet Pathol 46, 707–716. doi:10.1354/vp.08-VP-0234-O-FL

Madson, D.M., Ramamoorthy, S., Kuster, C., Pal, N., Meng, X.J., Halbur, P.G., Opriessnig, T., 2009b. Infectivity of porcine circovirus type 2 DNA in semen from experimentally-infected

boars. Vet Res 40. doi:10.1051/vetres:2008048

Madson, D. M., Patterson, A.R., Ramamoorthy, S., Pal, N., Meng, X.J., Opriessnig, T., 2009c. Effect of Porcine Circovirus Type 2 (PCV2) Vaccination of the Dam on PCV2 Replication In Utero. Clin Vaccine Immunol 16, 830–834. doi:10.1128/CVI.00455-08

Madson, D.M., Ramamoorthy, S., Kuster, C., Pal, N., Meng, X.-J., Halbur, P.G., Opriessnig, T., 2008. Characterization of shedding patterns of Porcine circovirus types 2a and 2b in experimentally inoculated mature boars. J Vet Diagn Invest 20, 725–734. doi:10.1177/104063870802000603

Mankertz, A., Domingo, M., Folch, J.M., Lecann, P., Jestin, A., Segalés, J., Chmielewicz, B., Plana-Durán, J., Soike, D., 2000. Characterisation of PCV-2 isolates from Spain, Germany and France. Virus Res 66, 65–77. doi:10.1016/S0168-1702(99)00122-7

Martelli, P., Saleri, R., Ferrarini, G., Angelis, E. De, Cavalli, V., Benetti, M., Ferrari, L., Canelli, E., Bonilauri, P., Arioli, E., Caleffi, A., Nathues, H., Borghetti, P., 2016. Impact of maternally derived immunity on piglets ' immune response and protection against porcine circovirus type 2 (PCV2) after vaccination against PCV2 at different age. BMC Vet Res 1–12. doi:10.1186/s12917-016-0700-1

Martelli, P., Ferrari, L., Ferrarini, G., De Angelis, E., Catella, A., Benetti, M., Nathues, H., Canelli, E., Borghetti, P., 2015. Influence of repeated porcine circovirus type 2 vaccination on sows' immune response. Vet Rec 177, 305. doi:10.1136/vr.103322

Martelli, P., Ferrari, L., Morganti, M., Angelis, E. De, Bonilauri, P., Guazzetti, S., Caleffi, A., Borghetti, P., 2011. One dose of a porcine circovirus 2 subunit vaccine induces humoral and cell-mediated immunity and protects against porcine circovirus-associated disease under field conditions. Vet Microbiol 149, 339–351. doi:10.1016/j.vetmic.2010.12.008

Martín-Valls, G.E., Hidalgo, M., Cano, E., Mateu, E., 2018. Testing of umbilical cords by real time PCR is suitable for assessing vertical transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus under field conditions. Vet J 234, 27–29. doi:10.1016/j.tvjl.2018.01.008

Martin, H., Le Potier, M.F., Maris, P., 2008. Virucidal efficacy of nine commercial disinfectants against porcine circovirus type 2. Vet J 177, 388–393. doi:10.1016/j.tvjl.2007.06.016

Mateusen, B., Maes, D.G.D., Soom, A. Van, Lefebvre, D., Nauwynck, H.J., 2007. Effect of a porcine circovirus type 2 infection on embryos during early pregnancy. Theriogenology 68, 896–901. doi:10.1016/j.theriogenology.2007.07.014

McIntosh, K.A., Harding, J.C.S., Parker, S., Krakowka, S., Allan, G., Ellis, J.A., 2008. Quantitative polymerase chain reaction for Porcine circovirus-2 in swine feces in a Porcine circovirus disease-affected commercial herd and a nonaffected commercial herd. Can Vet J 49, 1189–1194.

McIntosh, K.A, Harding, J.C., Parker, S., Ellis, J.A., Appleyard, G.D., 2006a. Nested polymerase chain reaction detection and duration of porcine circovirus type 2 in semen with sperm morphological analysis from naturally infected boars. J.Vet.Diagn.Invest 18, 380–384.

McIntosh, K.A., Harding, J.C.S., Ellis, J.A., Appleyard, G.D., 2006b. Detecion of Porcine circovirus type 2 viremia and seroconversion in naturally infected pigs in a farrow-to-finish barn. Can J Vet Res 70, 58–61.

Mckeown, N.E., Opriessnig, T., Thomas, P., Guenette, D.K., Elvinger, F., Fenaux, M., Halbur, P.G., Meng, X.J., 2005. Effects of Porcine Circovirus Type 2 (PCV2) Maternal Antibodies on Experimental Infection of Piglets with PCV2. Clin Diagn Lab Immunol 12, 1347–1451. doi:10.1128/CDLI.12.11.1347

Meerts, P., Misinzo, G., Lefebvre, D., Nielsen, J., Bøtner, A., Kristensen, C.S., Nauwynck, H.J., 2006. Correlation between the presence of neutralizing antibodies against porcine circovirus 2 (PCV2) and protection against replication of the virus and development of PCV2-associated disease. BMC Vet Res 2, 6. doi:10.1186/1746-6148-2-6

Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación, 2020. El sector de la carne de cerdo en cifras. Principales Indicadores Económicos 2019.

Ministerio de Agricultura y Pesca Alimentación y Medio Ambiente, 2017. Documento sobre la gestión de las explotaciones porcinas para evitar la caudofagia.

Mueller-Doblies, D., Carrique-Mas, J.J., Sayers, A.R., Davies, R.H., 2010. A comparison of the efficacy of different disinfection methods in eliminating *Salmonella* contamination from turkey houses. J Appl Microbiol 109, 471–479. doi:10.1111/j.1365-2672.2010.04667.x

Muirhead, M.R., Alexander, T.J., 2002. Managing health and disease, in: Managing Pig Health and Treatment of Disease: A Reference for the Farm. 5M Enterprises, Sheffield, United Kingdom, pp. 118–225.

Nantel-Fortier, N., Letellier, A., Lachapelle, V., Fravalo, P., L'Homme, Y., Brassard, J., 2016. Detection and Phylogenetic Analysis of the Hepatitis E Virus in a Canadian Swine Production Network. Food Environ Virol 8, 296–304. doi:10.1007/s12560-016-9252-6

Nathues, C., Janssen, E., Duengelhoef, A., Nathues, H., grosse Beilage, E., 2018. Cross-sectional study on risk factors for Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus sow herd instability in German breeding herds. Acta Vet Scand 60, 1–8. doi:10.1186/s13028-018-0411-7

Nauwynck, H.J., Sánchez, R., Meerts, P., Lefebvre, D.J., Saha, D., Huang, L., Misinzo, G., 2012. Cell tropism and entry of porcine circovirus 2. Virus Res 164, 43–45. doi:10.1016/j.virusres.2011.11.003

Nawagitgul, P., Morozov, I., Bolin, S.R., Harms, P.A., Sorden, S.D., Paul, P.S., 2000. Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein. J Gen Virol 15, 2281–2287.

Neira, V., Allerson, M., Corzo, C., Culhane, M., Rendahl, A., Torremorell, M., 2018. Detection of influenza A virus in aerosols of vaccinated and non-vaccinated pigs in a warm environment. PLoS One 13. doi:10.1371/journal.pone.0197600

Neira, V., Rabinowitz, P., Rendahl, A., Paccha, B., Gibbs, S.G., Torremorell, M., 2016. Characterization of Viral Load, Viability and Persistence of Influenza A Virus in Air and on Surfaces of Swine Production Facilities. PLoS One 11. doi:10.1371/journal.pone.0146616

Neter, J., Wasserman, W., Kutner, M.H., 1990. Applied Linear Regression Models. Richard D. Irwin Inc, Homewood, Illinois.

Nielsen, G.B., Nielsen, J.P., Haugegaard, J., Leth, S.C., Larsen, L.E., Kristensen, C.S., Pedersen, K.S., Stege, H., Hjulsager, C.K., Houe, H., 2018. Comparison of serum pools and oral fluid samples for detection of porcine circovirus type 2 by quantitative real-time PCR in finisher pigs. Porc Heal Manag 1–10. doi:10.1186/s40813-018-0079-4

Nielsen, G.B., Nielsen, J.P., Haugegaard, J., Denwood, M.J., Houe, H., 2017. Effect of vaccination against sub-clinical Porcine Circovirus type 2 infection in a high-health finishing pig herd: A randomised clinical field trial. Prev Vet Med 141, 14–21. doi:10.1016/j.prevetmed.2017.04.003

Nielsen, J., Vincent, I.E., Bøtner, A., Ladekjær-Mikkelsen, A.S., Allan, G., Summerfield, A., McCullough, K.C., 2003. Association of lymphopenia with porcine circovirus type 2 induced postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). Vet Immunol Immunopathol 92, 97–111. doi:10.1016/S0165-2427(03)00031-X

Nöremark, M., Sternberg Lewerin, S., Ernholm, L., Frössling, J., 2016. Swedish Farmers' Opinions about Biosecurity and Their Intention to Make Professionals Use Clean Protective Clothing When Entering the Stable. Front Vet Sci 3. doi:10.3389/fvets.2016.00046

Nöremark, M., Frössling, J., Lewerin, S.S., 2010. Application of routines that contribute to on-farm biosecurity as reported by Swedish livestock farmers. Transbound Emerg Dis 57, 225–236. doi:10.1111/j.1865-1682.2010.01140.x

Norma ISO 13307, 2013. Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal: Etapa de producción primaria. Técnicas de muestreo. AENOR.

Norma ISO 18593, 2013. Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal: Métodos horizontales para las técnias de toma de muestras a partir de superficies utilizando placas de contacto e hisopos. AENOR.

O'Dea, M.A., Hughes, A.P., Davies, L.J., Muhling, J., Buddle, R., Wilcox, G.E., 2008. Thermal stability of porcine circovirus type 2 in cell culture. J Virol Methods 147, 61–66. doi:10.1016/j.jviromet.2007.07.029

Oba, P., Wieland, B., Mwiine, F.N., Erume, J., Gertzell, E., Jacobson, M., Dione, M.M., 2020. Status and gaps of research on respiratory disease pathogens of swine in Africa. Porc Heal Manag 6, 1–9. doi:10.1186/s40813-020-0144-7

Odo, N.U., Raynor, P.C., Beaudoin, A., Somrongthong, R., Scheftel, J.M., Donahue, J.G., Bender, J.B., 2015. Personal protective equipment use and handwashing among animal farmers: A multi-site assessment. J Occup Environ Hyg 12, 363–368. doi:10.1080/15459624.2015.1006635

Oh, Y., Seo, H.W., Han, K., Park, C., Chae, C., 2012. Protective effect of the maternally

derived porcine circovirus type 2 (PCV2)-specific cellular immune response in piglets by dam vaccination against PCV2 challenge. J Gen Virol 93, 1556–1562. doi:10.1099/vir.0.041749-0

Oliver-Ferrando, S., Segalés, J., López-soria, S., Callén, A., Merdy, O., Joisel, F., Sibila, M., 2018a. Exploratory field study on the effect of Porcine circovirus 2 (PCV2) sow vaccination on serological, virological and reproductive parameters in a PCV2 subclinically infected sow herd. BMC Vet Res 1–10. doi:10.1186/s12917-018-1452-x

Oliver-Ferrando, S., Segalés, J., Sibila, M., Díaz, I., 2018b. Comparison of cytokine profiles in peripheral blood mononuclear cells between piglets born from Porcine circovirus 2 vaccinated and non-vaccinated sows. Vet Microbiol 214, 148–153. doi:10.1016/j.vetmic.2017.12.011

Oliver-Ferrando, S., Segalés, J., López-Soria, S., Callén, A., Merdy, O., Joisel, F., Sibila, M., 2016. Evaluation of natural porcine circovirus type 2 (PCV2) subclinical infection and seroconversion dynamics in piglets vaccinated at different ages. Vet Res 47, 1–11. doi:10.1186/s13567-016-0405-2

Olvera, A., Cortey, M., Segalés, J., 2007. Molecular evolution of porcine circovirus type 2 genomes: Phylogeny and clonality. Virology 357, 175–185. doi:10.1016/j.virol.2006.07.047

Olvera, A., Sibila, M., Calsamiglia, M., Segalés, J., Domingo, M., 2004. Comparison of porcine circovirus type 2 load in serum quantified by a real time PCR in postweaning multisystemic wasting syndrome and porcine dermatitis and nephropathy syndrome naturally affected pigs. J Virol Methods 117, 75–80. doi:10.1016/j.jviromet.2003.12.007

Opriessnig, T., Karuppannan, A.K., Castro, A.M.M.G., Xiao, C.T., 2020. Porcine circoviruses: current status, knowledge gaps and challenges. Virus Res 286, 198044. doi:10.1016/j.virusres.2020.198044

Opriessnig, T., Gerber, P.F., Xiao, C.T., Halbur, P.G., Matzinger, S.R., Meng, X.J., 2014a. Commercial PCV2a-based vaccines are effective in protecting naturally PCV2b-infected finisher pigs against experimental challenge with a 2012 mutant PCV2. Vaccine 32, 4342–4348. doi:10.1016/j.vaccine.2014.06.004

Opriessnig, T., Gerber, P.F., Xiao, C.T., Mogler, M., Halbur, P.G., 2014b. A commercial vaccine based on PCV2a and an experimental vaccine based on a variant mPCV2b are both effective in protecting pigs against challenge with a 2013 U.S. variant mPCV2b strain. Vaccine 32, 230–237. doi:10.1016/j.vaccine.2013.11.010

Opriessnig, T., Xiao, C.T., Gerber, P.F., Halbur, P.G., 2013. Emergence of a novel mutant PCV2b variant associated with clinical PCVAD in two vaccinated pig farms in the U.S. concurrently infected with PPV2. Vet Microbiol 163, 177–183. doi:10.1016/j.vetmic.2012.12.019

Opriessnig, T., Halbur, P.G., 2012. Concurrent infections are important for expression of porcine circovirus associated disease. Virus Res 164, 20–32. doi:10.1016/j.virusres.2011.09.014

Opriessnig, T., Langohr, I., 2012. Current state of knowledge on porcine circovirus type 2-associated lesions. Vet Pathol 50, 23–38. doi:10.1177/0300985812450726

Opriessnig, T., Madson, D.M., Schalk, S., Brockmeier, S., Shen, H.G., Beach, N.M., Meng, X.J., Baker, R.B., Zanella, E.L., Halbur, P.G., 2011a. Porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination is effective in reducing disease and PCV2 shedding in semen of boars concurrently infected with PCV2 and *Mycoplasma hyopneumoniae*. Theriogenology 76, 351–360. doi:10.1016/j.theriogenology.2011.02.014

Opriessnig, T, Madson, D.M., Roof, M., Layton, S.M., Ramamoorthy, S., Meng, X.J., Halbur, P.G., 2011b. Experimental Reproduction of Porcine Circovirus Type 2 (PCV2)-Associated Enteritis in Pigs Infected with PCV2 Alone or Concurrently with *Lawsonia intracellularis* or *Salmonella typhimurium*. J Comp Pathol 145, 261–270. doi:10.1016/j.jcpa.2010.12.016

Opriessnig, T., Patterson, A.R., Madson, D.M., Pal, N., Ramamoorthy, S., Meng, X.J., Halbur, P.G., 2010. Comparison of the effectiveness of passive (dam) versus active (piglet) immunization against porcine circovirus type 2 (PCV2) and impact of passively derived PCV2 vaccine-induced immunity on vaccination. Vet Microbiol 142, 177–183. doi:10.1016/j.vetmic.2009.09.056

Opriessnig, T., Patterson, A.R., Jones, D.E., Juhan, N.M., Meng, X., Halbur, P.G., 2009a. Limited susceptibility of three different mouse. Can J Vet Res 81–86.

Opriessnig, T., Patterson, A.R., Meng, X.J., Halbur, P.G., 2009a. Porcine circovirus type

2 in muscle and bone marrow is infectious and transmissible to naïve pigs by oral consumption. Vet Microbiol 133, 54–64. doi:10.1016/j.vetmic.2008.06.018

Opriessnig, T., Patterson, A.R., Madson, D.M., Pal, N., Rothschild, M., Kuhar, D., Lunney, J.K., Juhan, N.M., Meng, X.J., Halbur, P.G., 2009b. Difference in severity of porcine circovirus type two-induced pathological lesions between Landrace and Pietrain pigs. J Anim Sci 87, 1582–1590. doi:10.2527/jas.2008-1390

Opriessnig, T., Patterson, A.R., Madson, D.M., Pal, N., Halbur, P.G., 2009c. Comparison of efficacy of commercial one dose and two dose PCV2 vaccines using a mixed PRRSV–PCV2–SIV clinical infection model 2–3-months post vaccination. Vaccine 27, 1002–1007. doi:10.1016/j.vaccine.2008.11.105

Opriessnig, T., Madson, D.M., Prickett, J.R., Kuhar, D., Lunney, J.K., Elsener, J., Halbur, P.G., 2008a. Effect of porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination on porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and PCV2 coinfection. Vet Microbiol 131, 103–114. doi:10.1016/j.vetmic.2008.03.002

Opriessnig, T., Patterson, A.R., Elsener, J., Meng, X.J., Halbur, P.G., 2008b. Influence of maternal antibodies on efficacy of porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination to protect pigs from experimental infection with PCV2. Clin Vaccine Immunol 15, 397–401. doi:10.1128/CVI.00416-07

Opriessnig, T., Meng, X., Halbur, P.G., 2007. Porcine circovirus type 2–associated disease: Update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. J Vet Diagn Invest 615, 591–615.

Opriessnig, T., Fenaux, M., Thomas, P., Hoogland, M.J., Rothschild, M.F., Meng, X.J., Halbur, P.G., 2006a. Evidence of breed-dependent differences in susceptibility to porcine circovirus type-2-associated disease and lesions. Vet Pathol 43, 281–293. doi:10.1354/vp.43-3-281

Opriessnig, T., McKeown, N.E., Harmon, K.L., Meng, X.J., Halbur, P.G., 2006b. Porcine circovirus type 2 infection decreases the efficacy of a modified live porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine. Clin Vaccine Immunol 13, 923–929. doi:10.1128/CVI.00074-06

Opriessnig, T., Yu, S., Thacker, E.L., Halbur, P.G., Elisa, O.R.F., 2004a. Derivation of porcine circovirus type 2-negative pigs from positive breeding herds. J Swine Health Prod 12, 186–191.

Opriessnig, T., Thacker, E.L., Fenaux, M., Meng, X.-J., Halbur, P.G., 2004b Experimental Reproduction of Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome in Pigs by Dual Infection with *Mycoplasma hyopneumoniae* and Porcine Circovirus Type 2. Vet Pathol 41, 624–640.

Opriessnig, T., Fenaux, M., Yu, S., Evans, R.B., Cavanaugh, D., Gallup, J.M., Pallares, F.J., Thacker, E.L., Lager, K.M., Meng, X.J., Halbur, P.G., 2004c. Effect of porcine parvovirus vaccination on the development of PMWS in segregated early weaned pigs coinfected with type 2 porcine circovirus and porcine parvovirus. Vet Microbiol 98, 209–220. doi:10.1016/j.vetmic.2003.11.006

Opriessnig, T., Gallup, J.M., Evans, R.B., Fenaux, M., Pallares, F., Thacker, E.L., Brockus, C.W., Ackermann, M.R., THomas, P., Meng, X.J., Halbur, P.G., 2003. Effect of Vaccination with Selective Bacterins on Conventional Pigs Infected with Type 2 Porcine Circovirus. Vet Pathol 529, 521–529.

Oropeza-Moe, M., Delgado, A.J.O., Framstad, T., 2017. Porcine circovirus type 2 associated reproductive failure in a specific pathogen free (SPF) piglet producing herd in Norway: A case report. Porc Heal Manag 3, 1–6. doi:10.1186/s40813-017-0072-3

Otake, S., Dee, S., Corzo, C., Oliveira, S., Deen, J., 2010. Long-distance airborne transport of infectious PRRSV and *Mycoplasma hyopneumoniae* from a swine population infected with multiple viral variants. Vet Microbiol 145, 198–208. doi:10.1016/j.vetmic.2010.03.028

Otake, S., Dee, S., Rossow, K.D., Deen, J., Joo, H.S., Molitor, T.W., Pijoan, C., 2002a. Transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by fomites (boots and coveralls). J Swine Health Prod 10, 59–65.

Otake, S., Dee, S.A., Rossow, K.D., Joo, H.S., Deen, J., Molitor, T.W., Pijoan, C., 2002b. Transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by needles. Vet Rec 150, 114–115.

Otake, S., Dee, S.A., Rossow, K.D., Moon, R.D., Pijoan, C., 2002c. Mechanical transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by mosquitoes, *Aedes vexans* (Meigen). Can J Vet Res 66, 191–195.

Ouyang, T., Zhang, X., Liu, X., Ren, L., 2019. Co-

Infection of Swine with Porcine Circovirus Type 2 and Other Swine Viruses. Viruses 11, 185. doi:10.3390/v11020185

Palinski, R., Piñeyro, P., Shang, P., Yuan, F., Guo, R., Fang, Y., Byers, E., Hause, B.M., 2017. A Novel Porcine Circovirus Distantly Related to Known Circoviruses Is Associated with Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome and Reproductive Failure. J Virol 91, 1–13.

Pallarés, F.J., Halbur, P.G., Opriessnig, T., Sorden, S.D., Villar, D., Janke, B.H., Yaeger, M.J., Larson, D.J., Scwartz, K.J., Yoon, K.J., Hoffman, L.J., 2001. Porcine circovirus type 2 (PCV-2) coinfections in US field cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). J Vet Diagn Invest 14, 515–519.

Park, C., Jeong, J., Choi, K., Chae, C., 2016. Efficacy of a new bivalent vaccine of porcine circovirus type 2 and Mycoplasma hyopneumoniae (Fostera™ PCV MH) under experimental conditions. Vaccine 34, 270–275. doi:10.1016/j.vaccine.2015.11.034

Park, C., Seo, H.W., Han, K., Chae, C., 2014. Comparison of Four Commercial One-Dose Porcine Circovirus Type 2 (PCV2) Vaccines Administered to Pigs Challenged with PCV2 and Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus at 17 Weeks Postvaccination To Control Porcine Respiratory Disease Complex u. Clin Vaccine Immunol 21, 399–406. doi:10.1128/CVI.00768-13

Park, J.S., Kim, J., Ha, Y., Jung, K., Choi, C., Lim, J.K., Kim, S.H., Chae, C., 2005. Birth abnormalities in pregnant sows infected intranasally with porcine circovirus 2. J Comp Pathol 132, 139–144. doi:10.1016/j.jcpa.2004.09.003

Park, K.H., Oh, T., Yang, S., Cho, H., Kang, I., Chae, C., 2019. Evaluation of a porcine circovirus type 2a (PCV2a) vaccine efficacy against experimental PCV2a, PCV2b, and PCV2d challenge. Vet Microbiol 231, 87–92. doi:10.1016/j.vetmic.2019.03.002

Patterson, A.H., Rubin, J.E., Fernando, C., Costa, M.O., Harding, J.C.S., Hill, J.E., 2013. Fecal shedding of Brachyspira spp. on a farrow-to-finish swine farm with a clinical history of *"Brachyspira hampsonii"* -associated colitis. BMC Vet Res 9, 1. doi:10.1186/1746-6148-9-137

Patterson, A.R., Baker, R.., Madson, D.M., Pintar, A.L., Opriessnig, T., 2011a. Disinfection protocols reduce the amount of porcine circovirus type 2 in contaminated 1:61 scale model livestock transport vehicles. J Swine Health Prod 19, 156–164.

Patterson, A.R., Madson, D.M., Halbur, P.G., Opriessnig, T., 2011b. Shedding and infection dynamics of porcine circovirus type 2 (PCV2) after natural exposure. Vet Microbiol 149, 225–229. doi:10.1016/j.vetmic.2010.10.021

Patterson, A.R., Ramamoorthy, S., Madson, D.M., Meng, X.J., Halbur, P.G., Opriessnig, T., 2011c. Shedding and infection dynamics of porcine circovirus type 2 (PCV2) after experimental infection. Vet Microbiol 149, 91–98. doi:10.1016/j.vetmic.2010.10.020

Patterson, A.R., Madson, D.M., Schalk, S.D., Halbur, P.G., Opriessnig, T., 2011d. Establishment and maintenance of a porcine circovirus type 2 (PCV2)-free breeding herd on a site that experienced a natural outbreak of PCV2-associated reproductive disease. Swine Heal Prod 19, 165–174.

Pejsak, Z., Kusior, G., Pomorska-Mól, M., Podgórska, K., 2012. Influence of long-term vaccination of a breeding herd of pigs against PCV2 on reproductive parameters. Pol J Vet Sci 15, 37–42. doi:10.2478/v10181-011-0111-y

Pejsak, Z., Podgórska, K., Truszczyński, M., Karbowiak, P., Stadejek, T., 2010. Efficacy of different protocols of vaccination against porcine circovirus type 2 (PCV2) in a farm affected by postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). Comp Immunol Microbiol Infect Dis 33, 1–5. doi:10.1016/j.cimid.2009.09.006

Pensaert, M.B., Sánchez, R.E., Ladekjær-Mikkelsen, A., Allan, G.M., Nauwynck, H.J., 2004. Viremia and effect of fetal infection with porcine viruses with special reference to porcine circovirus 2 infection. Vet Microbiol 98, 175–183. doi:10.1016/j.vetmic.2003.10.011

Pérez-Martín, E., Rovira, A., Calsamiglia, M., Mankertz, A., Rodríguez, F., Segalés, J., 2007. A new method to identify cell types that support porcine circovirus type 2 replication in formalin-fixed, paraffin-embedded swine tissues. J Virol Methods 146, 86–95. doi:10.1016/j.jviromet.2007.06.005

Phan, T.G., Giannitti, F., Rossow, S., Marthaler, D., Knutson, T., Li, L., Deng, X., Resende, T., Vannucci, F., Delwart, E., 2016. Detection of a novel circovirus PCV3 in pigs with cardiac and multi-systemic inflammation. Virol J 1–

8. doi:10.1186/s12985-016-0642-z

Pimentel, R.S., 2009. Kendall's Tau and Spearman's Rho for Zero-Inflated Data.

Pinheiro, A.L., Silva, L.H., Souza, T., De Paula, M., Valério, O., Costa, M., Carvalho, R.M., de Almeida, M.R., Silva, A., 2013. Verification of natural infection of peridomestic rodents by PCV2 on commercial swine farms. Res Vet Sci 94, 764–768. doi:10.1016/j.rvsc.2012.10.006

Pitkin, A., Deen, J., Dee, S., 2009a. Further assessment of fomites and personnel as vehicles for the mechanical transport and transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Can J Vet Res 73, 298–302.

Pitkin, A., Deen, J., Dee, S., 2009b. Use of a production region model to assess the airborne spread of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Vet Microbiol 136, 1–7. doi:10.1016/j.vetmic.2008.10.013

Pletinckx, L.J., Verhegghe, M., Dewulf, J., Crombé, F., De Bleecker, Y., Rasschaert, G., Goddeeris, B.M., De Man, I., 2011. Screening of poultry-pig farms for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Sampling methodology and within herd prevalence in broiler flocks and pigs. Infect Genet Evol 11, 2133–2137. doi:10.1016/j.meegid.2011.07.008

Pogranichniy, R.M., Yoon, K.J., Harms, P.A., Sorden, S.D., Daniels, M., 2002. Case-control study on the association of porcine circovirus type 2 and other swine viral pathogens with postweaning multisystemic wasting syndrome. J Vet Diagn Invest 14, 449–456. doi:10.1177/104063870201400601

Pogranichnyy, R.M., Yoon, K.J., Harms, P.A., Swenson, S.L., Zimmerman, J.J., Sorden, S.D., 2000. Characterization of immune response of young pigs to porcine circovirus type 2 infection. Viral Immunol 13, 143–53. doi:10.1089/vim.2000.13.143.

Poonsuk, K., Arunorat, J., Talummuk, S., Kunalintip, R., Anuvongnukroh, W., Thanawongnuwech, R., 2013. Field Efficacy of Potassium Peroxymonosulfate (PMS) Oxidizing Disinfectant (VirusnipTM) against Porcine Circovirus Type 2 (PCV2) in Gilt Acclimatization Unit. Thai J Vet Med 43, 601–604.

Prickett, J.R., Johnson, J., Murtaugh, M.P., Puvanendiran, S., Wang, C., Zimmerman, J.J., Opriessnig, T., 2011. Prolonged Detection of PCV2 and Anti-PCV2 Antibody in Oral Fluids Following Experimental Inoculation. Transbound Emerg Dis 58, 121–127. doi:10.1111/j.1865-1682.2010.01189.x

Prickett, J.R., Kim, W., Simer, R., Yoon, K., Zimmerman, J.J., 2008. Oral-fluid samples for surveillance of commercial growing pigs for porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2 infections. J Swine Health Prod 16, 86–91.

Prieto, A., López-Lorenzo, G., Díaz, P., Díaz-Cao, J.M., Díez-Baños, P., Fernández, G., 2018. Viral and Bacterial Environmental Detection in Livestock Farms. Ref Modul Earth Syst Environ Sci. doi:10.1016/B978-0-12-409548-9.11252-7

Prieto, A., Fernández-Antonio, R., Díaz-Cao, J.M., López, G., Díaz, P., Alonso, J.M., Morrondo, P., Fernández, G., 2017. Distribution of Aleutian mink disease virus contamination in the environment of infected mink farms. Vet Microbiol 204, 59–63. doi:10.1016/j.vetmic.2017.04.013

Prieto, A., Díaz-Cao, J., Fernández-Antonio, R., Panadero, R., Díaz, P., López, C., Morrondo, P., Díez-Baños, P., Fernández, G., 2014. Application of real-time PCR to detect Aleutian Mink Disease Virus on environmental farm sources. Vet Microbiol 173, 355–359. doi:10.1016/j.vetmic.2014.07.024

Pritchard, G., Dennis, I., Waddilove, J., 2005. Biosecurity: Reducing disease risks to pig breeding herds. Farm Anim Pract 27, 230–237. doi:10.1136/inpract.27.5.230

Prost, K., Kloeze, H., Mukhi, S., Bozek, K., Poljak, Z., Mubareka, S., 2019. Bioaerosol and surface sampling for the surveillance of influenza A virus in swine. Transbound Emerg Dis 66, 1210–1217. doi:10.1111/tbed.13139

Puvanendiran, S., Stone, S., Yu, W., Johnson, C.R., Abrahante, J., Jimenez, L.G., Griggs, T., Haley, C., Wagner, B., Murtaugh, M.P., 2011. Absence of porcine circovirus type 1 (PCV1) and high prevalence of PCV 2 exposure and infection in swine finisher herds. Virus Res 157, 92–98. doi:10.1016/j.virusres.2011.02.012

Quiles, A., Hevia, M.L., 2006. Limpieza y desinfección: tecnología todo dentro/todo fuera. Prod Anim 38–50.

Quintana-Hayashi, M.P., Thakur, S., 2012. Longitudinal Study of the Persistence of Antimicrobial-Resistant *Campylobacter* Strains in Distinct Swine Production

Systems on Farms , at Slaughter , and in the Environment. Aplied Environ Microbiol 78, 2698–2705. doi:10.1128/AEM.07723-11

Quintana, J., Balasch, M.B., Segalés, J., Calsamiglia, M., Rodríguez-Arrioja, G.M., Plana-Durán, J., Domingo, M., 2002. Original article Experimental inoculation of porcine circoviruses type 1 (PCV1) and type 2 (PCV2) in rabbits and mice. Vet Res 33, 229–237. doi:10.1051/vetres

Quintana, J., Segalés, J., Rosell, C., Calsamiglia, M., Rodríguez-Arrioja, G.., Chianini, F., Folch, J.., Maldonado, J., Canal, M., Plana-Durán, J., Domingo, M., 2001. Clinical and pathological observations on pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. Vet Rec 149, 357–361. doi:10.1136/vr.149.12.357

Real Decreto 306/2020 de 11 de febrero, por el que se establecen normas básicas de ordenación de las granjas porcinas pntensivas, y se modifica la normativa básica de ordenación de las explotaciones de ganado porcino extensivo, Boletín Oficial del Estado. España.

Ren, L., Chen, X., Ouyang, H., 2016. Interactions of porcine circovirus 2 with its hosts. Virus Genes 52, 437–444. doi:10.1007/s11262-016-1326-x

Resendes, A., Segalés, J., Balasch, M.B., Calsamiglia, M., Sibila, M., Ellerbrok, H., Mateu, E., Plana-Durán, J., Mankertz, A., Domingo, M., 2004. Lack of an effect of a commercial vaccine adjuvant on the development of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in porcine circovirus type 2 (PCV2) experimentally infected conventional pigs. Vet Res 35, 83–90. doi:10.1051/vetres

Ribbens, S., Dewulf, J., Koenen, F., Maes, D., De Kruif, A., 2007. Evidence of indirect transmission of classical swine fever virus through contacts with people. Vet Rec 160, 687–690. doi:10.1136/vr.160.20.687

Ridley, A., Morris, V., Gittins, J., Cawthraw, S., Harris, J., Edge, S., Allen, V., 2011. Potential sources of *Campylobacter* infection on chicken farms: Contamination and control of broiler-harvesting equipment, vehicles and personnel. J Appl Microbiol 111, 233–244. doi:10.1111/j.1365-2672.2011.05038.x

Rodríguez-Arrioja, G.M., Segalés, J., Calsamiglia, M., Resendes, A.R., Balasch, M., Plana-durán, J., Casal, J., Domingo, M., 2002. Dynamics of porcine circovirus type 2 infection in a herd of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. Am J Vet Res 63, 354–357.

Romagosa, A., Gramer, M., Joo, H.S., Torremorell, M., 2012. Sensitivity of oral fluids for detecting influenza A virus in populations of vaccinated and non-vaccinated pigs. Influenza Other Respi Viruses 6, 110–118. doi:10.1111/j.1750-2659.2011.00276.x

Rose, N., Opriessnig, T., Grasland, B., Jestin, A., 2012. Epidemiology and transmission of porcine circovirus type 2 (PCV2). Virus Res 164, 78–89. doi:10.1016/j.virusres.2011.12.002

Rose, N., Eveno, E., Grasland, B., Nignol, A., Oger, A., Jestin, A., Madec, F., 2009. Individual risk factors for Post-weaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS) in pigs: A hierarchical Bayesian survival analysis. Prev Vet Med 90, 168–179. doi:10.1016/j.prevetmed.2009.04.010

Rose, N., Abherv, A., Diguerher, L.E., Eveno, E., Jolly, J., Blanchard, P., 2004. Effet de la génétique Piétrain sur l'expression clinique de la maladie de l'amaigrissement du porcelet (MAP). Journées 36, 339–344.

Rose, N., Larour, G., Le Diguerher, G., Eveno, E., Jolly, J.P., Blanchard, P., Oger, A., Le Dimna, M., Jestin, A., Madec, F., 2003. Risk factors for porcine post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in 149 French farrow-to-finish herds. Prev Vet Med 61, 209–225. doi:10.1016/j.prevetmed.2003.07.003

Rosell, C., Segalés, J., Folch, J.M., Duran, C., Balasch, M., Domingo, M., 2000. Porcine dermatitis and nephropathy syndrome. Vet Rec 146, 40–44.

Rosell, C., Segalés, J., Plana-Durán, J., Balasch, M., Rodríguez-Arrioja, G.M., Kennedy, S., Allan, G.M., McNeilly, F., Latimer, K.S., Domingo, M., 1999. Pathological, Immunohistochemical, and In-situ Hybridization Studies of Natural Cases of Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS) in Pigs. J Comp Pathol 120, 59–78. doi:10.1053/jcpa.1998.0258

Rovira, A., Balasch, M., Segalés, J., García, L., Plana-Durán, J., Rosell, C., Ellerbrok, H., Mankertz, A., Domingo, M., 2002. Experimental Inoculation of Conventional Pigs with Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus and Porcine Circovirus 2. J Virol 76, 3232–3239. doi:10.1128/JVI.76.7.3232

Royer, R.L., Nawagitgul, P., Halbur, P.G., Paul,

P.S., 2001. Susceptibiliy of PCV2 to commercial and laboratory disinfectants. J Swine Health Prod 9, 281–284.

Ruiz-Ripa, L., Feßler, A.T., Hanke, D., Sanz, S., Olarte, C., Mama, O.M., Eichhorn, I., Schwarz, S., Torres, C., 2020. Coagulase-negative staphylococci carrying *cfr* and PVL genes, and MRSA/MSSA-CC398 in the swine farm environment. Vet Microbiol 243, 108631. doi:10.1016/j.vetmic.2020.108631

Ruston, C., Linhares, D., Thomas, P., Holtkamp, D., 2019. Pilot study to evaluate the use of a fluorescent powder (Glo Germ) to study the transfer of contamination from livestock trailers to the center alleyway and pens in the barn during marketing events. Project #19-147 SHIC.

Sahlström, L., Virtanen, T., Kyyrö, J., Lyytikäinen, T., 2014. Biosecurity on Finnish cattle, pig and sheep farms - results from a questionnaire. Prev Vet Med 117, 59–67. doi:10.1016/j.prevetmed.2014.07.004

Sánchez, R.E., Meerts, P., Nauwynck, H.J., Pensaert, M.B., 2003. Change of porcine circovirus 2 target cells in pigs during development from fetal to early postnatal life. Vet Microbiol 95, 15–25. doi:10.1016/S0378-1135(03)00120-2

Sánchez, R.E., Nauwynck, H.J., Mcneilly, F., Allan, G.M., Pensaert, M.B., 2001. Porcine circovirus 2 infection in swine foetuses inoculated at different stages of gestation. Vet Microbiol 83, 169–176.

Sanz, S., Olarte, C., Martínez-olarte, R., Navajas-benito, E. V, Alonso, C.A., Hidalgo-sanz, S., Somalo, S., Torres, C., 2015. Airborne dissemination of *Escherichia coli* in a dairy cattle farm and its environment. Int J Food Microbiol 197, 40–44. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.12.010

Saporiti, V., Cruz, T.F., Correa, F., Jose, F., Sibila, M., Segalés, J., 2020. Similar frequency of Porcine circovirus 3 (PCV-3) detection in serum samples of pigs affected by digestive or respiratory disorders and age - matched clinically healthy pigs. Transbound Emerg Dis 3, 199–205. doi:10.1111/tbed.13341

Sarli, G., Mandrioloi, S., Panarese, S., B, B., Segalés, J., Domínguez, J., Marcato, P.S., 2008. Characterization of Interstitial Nephritis in Pigs with Naturally Occurring Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome. Vet Pathol 18, 12–18.

Schmithausen, R.M., Schulze-geisthoevel, S.V., Stemmer, F., El-Jade, M., Reif, M., Hack, S., Meilaender, A., Montabauer, G., Fimmers, R., Parcina, M., Hoerauf, A., Exner, M., Petersen, B., Bierbaum, G., Bekeredjian-Dinj, I., 2015. Analysis of Transmission of MRSA and ESBL-E among Pigs and Farm Personnel. PLoS One 1–23. doi:10.1371/journal.pone.0138173

Schmoll, F., Lang, C., Steinrigl, A.S., Schulze, K., Kauffold, J., 2008. Prevalence of PCV2 in Austrian and German boars and semen used for artificial insemination. Theriogenology 69, 814–821. doi:10.1016/j.theriogenology.2007.12.009

Schulze, C., Segalés, J., Neumann, G., Hlinak, A., Calsamiglia, M., Domingo, M., 2004. Identification of postwearing multisystemic wasting syndrome in European wild boar (Sus scrofa). Vet Rec 154, 694–696. doi:10.1136/vr.154.22.694

Seeliger, F.., Brügman, M.L., Krüger, L., Greiser-Wilke, I., Verspohl, J., Segalés, J., Baumgärtner, W., 2007. Porcine Circovirus Type 2-Associated Cerebellar Vasculitis in Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS) -Affected Pigs. Vet Pathol 44, 621–634.

Segalés, J., 2016. Vacunación frente a PCV-2, mirando al futuro, in: PorciFORUM. Lleida, pp. 36–42.

Segalés, J., 2015. Best practice and future challenges for vaccination against porcine circovirus type 2. Expert Rev Vaccines 14, 473–487. doi:10.1586/14760584.2015.983084

Segalés, J., Kekarainen, T., Cortey, M., 2013. The natural history of porcine circovirus type 2: From an inoffensive virus to a devastating swine disease? Vet Microbiol 165, 13–20. doi:10.1016/j.vetmic.2012.12.033

Segalés, J., 2012. Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: Clinical signs, pathology and laboratory diagnosis. Virus Res 164, 10–19. doi:10.1016/j.virusres.2011.10.007

Segalés, J., Urniza, A., Alegre, A., Bru, T., Crisci, E., Nofrarías, M., López-Soria, S., Balasch, M., Sibila, M., Chu, H.-J., Fraile, L., Plana-Durán, J., 2009. A genetically engineered chimeric vaccine against porcine circovirus type 2 (PCV2) improves clinical, pathological and virological outcomes in postweaning multisystemic wasting syndrome affected farms. Vaccine 27, 7313–7321. doi:10.1016/j.vaccine.2009.09.084

Segalés, J., Olvera, A., Grau-Roma, L., Charreyre, C., Nauwynck, H., Larsen, L., Dupont, K., McCullough, K., Ellis, J., Krakowka, S.,

Mankertz, A., Fredholm, M., Fossum, C., Timmusk, S., Stockhofe-Zurwieden, N., Beattie, V., Armstrong, D., Grassland, B., Baekbo, P., Allan, G., 2008. PCV-2 genotype definition and nomenclature. Vet Rec 162, 867–869.

Segalés, J., 2007. ¿Podemos controlar la circovirosis porcina? ¿Erradicacion? [WWW Document]. www.3tres3.com. URL https://www.3tres3.com/articulos/¿podemos-controlar-la-circovirosis-porcina-¿erradicacion_4164/

Segalés, J, Allan, G.M., Domingo, M., 2005a. Porcine circovirus diseases. Anim Health Res Rev 6, 119–142. doi:10.1079/AHR2005106

Segalés, J., Calsamiglia, M., Olvera, A., Sibila, M., Badiella, L., Domingo, M., 2005b. Quantification of porcine circovirus type 2 (PCV2) DNA in serum and tonsillar, nasal, tracheo-bronchial, urinary and faecal swabs of pigs with and without postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). Vet Microbiol 111, 223–229. doi:10.1016/j.vetmic.2005.10.008

Segalés, J., Domingo, M., Chianini, F., Majó, N., Domínguez, J., Darwich, L., Mateu, E., 2004a. Immunosuppression in postweaning multisystemic wasting syndrome affected pigs. Vet Microbiol 98, 151–158. doi:10.1016/j.vetmic.2003.10.007

Segalés, J., Rosell, C., Domingo, M., 2004b. Pathological findings associated with naturally acquired porcine circovirus type 2 associated disease. Vet Microbiol 98, 137–149. doi:10.1016/j.vetmic.2003.10.006

Segalés, J., Domingo, M., 2002. Postweaning mulstisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. A review. Vet Q 24, 109–124. doi:10.1080/01652176.2002.9695132

Segalés, J., Piella, J., Marco, E., Mateu, E., Espuña, E., Domingo, M., 1998. Porcine dermatitis and nephropathy syndrome in Spain. Vet Rec 2, 483–487.

Segalés, J., Sitjar, M., Domingo, M., Dee, S., Del Pozo, M., Noval, R., Sacristan, C., De las Heras, A., Ferro, A., 1997. First report of post-weaning multisystemic wasting syndrome in pigs in Spain. Vet Rec 156–157.

Seo, H.W., Park, C., Kang, I., Choi, K., Jeong, J., Park, S., Chae, C., 2014a. Genetic and antigenic characterization of a newly emerging porcine circovirus type 2b mutant first isolated in cases of vaccine failure in Korea. Arch Virol 3107–3111. doi:10.1007/s00705-014-2164-6

Seo, H.W., Lee, J., Han, K., Park, C., Chae, C., 2014b. Comparative analyses of humoral and cell-mediated immune responses upon vaccination with different commercially available single-dose porcine circovirus type 2 vaccines. Res Vet Sci 97, 38–42. doi:10.1016/j.rvsc.2014.04.007

Seo, H.W., Han, K., Park, C., Chae, C., 2014c. Clinical, virological, immunological and pathological evaluation of four porcine circovirus type 2 vaccines. Vet J 200, 65–70. doi:10.1016/j.tvjl.2014.02.002

Seo, H.W., Park, C., Han, K., Chae, C., 2014d. Effect of porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination on PCV2-viremic piglets after experimental PCV2 challenge. Vet Res 45, 1–9. doi:10.1186/1297-9716-45-13

Seo, H.W., Han, K., Oh, Y., Kang, I., Park, C., Chae, C., 2013. Comparison of three commercial one-dose porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccines on PCV2 shedding in semen from experimentally infected boars. Vet Microbiol 164, 145–149. doi:10.1016/j.vetmic.2013.01.046

Seo, H.W., Oh, Y., Han, K., Park, C., Chae, C., 2012. Reduction of porcine circovirus type 2 (PCV2) viremia by a reformulated inactivated chimeric PCV1-2 vaccine-induced humoral and cellular immunity after experimental PCV2 challenge. BMC Vet Res 8, 1–9. doi:10.1186/1746-6148-8-194

Sergeant, ESG, 2018. Epitools Epidemiological Calculators [WWW Document]. Ausvet. URL https://epitools.ausvet.com.au/

Shen, H.G., Halbur, P.G., Opriessnig, T., 2012. Prevalence and phylogenetic analysis of the current porcine circovirus 2 genotypes after implementation of widespread vaccination programmes in the USA. J Gen Virol 93, 1345–1355. doi:10.1099/vir.0.039552-0

Shen, H., Wang, C., Madson, D.M., Opriessnig, T., 2010. High prevalence of porcine circovirus viremia in newborn piglets in five clinically normal swine breeding herds in North America. Prev Vet Med 97, 228–236. doi:10.1016/j.prevetmed.2010.09.020

Shibata, I., Okuda, Y., Kitajima, K., Asai, T., 2006. Shedding of porcine circovirus into colostrum of sows. J Vet Med Ser B Infect Dis Vet Public Heal 53, 278–280. doi:10.1111/j.1439-0450.2006.00953.x

Shibata, I., Okuda, Y., Yazawa, S., Ono, M., Sasaki, T., Itagaki, M., Nakajima, N., Okabe,

Y., Hidejima, I., 2003. PCR Detection of Porcine circovirus type 2 DNA in Whole Blood, Serum, Oropharyngeal Swab, Nasal Swab, and Feces from Experimentally Infected Pigs and Field Cases. J Vet Med Sci 65, 405–408.

Sibila, M., Guevara, G., Cuadrado, R., Pleguezuelos, P., Pérez, D., Pérez De Rozas, A., Huerta, E., Llorens, A., Valero, O., Pérez, M., López, C., Krejci, R., Segalés, J., 2020. Comparison of *Mycoplasma hyopneumoniae* and porcine circovirus 2 commercial vaccines efficacy when applied separate or combined under experimental conditions. Porc Heal Manag 6, 1–11. doi:10.1186/s40813-020-00148-0

Sibila, M., Calsamiglia, M., Segalés, J., Blanchard, P., Badiella, L., Dimna, M. Le, Jestin, A., Domingo, M., 2004. Use of a polymerase chain reaction assay and an ELISA to monitor porcine circovirus type 2 infection in pigs from farms with and without postweaning multisystemic wasting syndrome. Am J Vet Res 65, 88–92.

Simon-Grifé, M., Martín-Valls, G.E., Vilar, M.J., García-Bocanegra, I., Martín, M., Mateu, E., Casal, J., 2013. Biosecurity practices in Spanish pig herds: Perceptions of farmers and veterinarians of the most important biosecurity measures. Prev Vet Med 110, 223–231. doi:10.1016/j.prevetmed.2012.11.028

Song, T., Zhang, S., Jianxilang, H., Shuyang, X., Weirong, H., Menghu, T., Wenao, L., Rui, T., Xunfu, L., Ping, R., Hai, R., Chunfang, W., Qiyuan, F., Zengjun, M., 2019. First detection and genetic analysis of fox - origin porcine circovirus type 2. Transbound Emerg Dis 66, 1–6. doi:10.1111/tbed.13004

Soraci, A., 2018. Manejo fisiológico del calostrado... Donde todo comienza, in: IV Jornada de La Asociación Gallega de Veterinarios de Porcino.

Sorden, S.D., 2000. Update on porcine circovirus and postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) 8, 133–136.

Sorden, S.D., Harms, P.A., Nawagitgul, P., Cavanaugh, D., Paul, P.S., 1999. Development of a polyclonal-antibody-based immunohistochemical method for the detection of type 2 porcine circovirus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. J Vet Diagn Invest 11, 528–530.

Stadejek, T., Wozniak, A., Milek, D., Biernacka, K., 2017. First detection of porcine circovirus type 3 on commercial pig farms in Poland. Transbound Emerg Dis 1–4. doi:10.1111/tbed.12672

Stein, H., Schulz, J., Morgenstern, R., Voglmayr, T., Freymüller, G., Sinn, L., Rümenapf, T., Hennig-Pauka, I., Ladinig, A., 2018. Use of three air samplers for the detection of PRRSV-1 under experimental and field conditions. Animals 8, 4–9. doi:10.3390/ani8120233

Steiner, E., Balmelli, C., Gerber, H., Summerfield, A., McCullough, K., 2009. Cellular adaptive immune response against porcine circovirus type 2 in subclinically infected pigs. BMC Vet Res 5, 1–13. doi:10.1186/1746-6148-5-45

Stürzenbaum, S.R., Kille, P., 2001. Control genes in quantitative molecular biological techniques: The variability of invariance. Comp Biochem Physiol - B Biochem Mol Biol 130, 281–289. doi:10.1016/S1096-4959(01)00440-7

Sydler, T., Brägger, S., Handke, M., Hartnack, S., Lewis, F.I., Sidler, X., Brugnera, E., 2016. Latent porcine circovirus type 2-infected domestic pigs: A potential infection model for the effective development of vaccines against latent or chronic virus induced diseases. Vaccine 34, 1047–1053. doi:10.1016/j.vaccine.2016.01.005

Taylor, P., Zuo, Z., Kuehn, T.H., Verma, H., Kumar, S., Goyal, S.M., Raynor, P.C., Ge, S., Pui, D.Y.H., Zuo, Z., Kuehn, T.H., Verma, H., Kumar, S., Goyal, S.M., Appert, J., Raynor, P.C., Ge, S., Pui, D.Y.H., 2013. Association of Airborne Virus Infectivity and Survivability with its Carrier Particle Size. Aerosol Sci Technol 47, 373–382. doi:10.1080/02786826.2012.754841

Team, R.C., 2018. R: A language and environment for statistical computing.

Thakur, K.K., Revie, C.W., Hurnik, D., Sanchez, J., 2017. Modelling contamination of trucks used in the shipment of pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. J Swine Health Prod 25, 183–193. doi:10.1016/j.virusres.2013.01.011

Thedell, T.D., Mull, J.C., Olenchock, S.A., 1980. A brief report of gram-negative bacterial endotoxin levels in airborne and settled dusts in animal confinement buildings. Am J Ind Med 1, 3–7. doi:10.1002/ajim.4700010103

Thrusfield, M., 2008. Surveys, in: Thrusfield, M. (Ed.), Veterinary Epidemiology. Blackwell Science, Oxford, pp. 228–246.

Ticó, G., Segalés, J., Martínez, J., 2013. The blurred border between porcine circovirus type 2-systemic disease and porcine respiratory disease complex. Vet Microbiol 163, 242–247. doi:10.1016/j.vetmic.2013.01.001

Tischer, I., Bode, L., Peters, D., Pociuli, S., Germann, B., 1995. Distribution of antibodies to porcine circovirus in swine populations of different breeding farms. Arch Virol 140, 737–743. doi:10.1007/BF01309961

Tischer, I., Peters, D., Rasch, R., Pociuli, S., 1987. Replication of porcine circovirus: induction by glucosamine and cell cycle dependence. Arch Virol 96, 39–57. doi:10.1007/BF01310989

Tischer, I., Gelderblom, H., Vettermann, W., Koch, M.A., 1982. A very small porcine virus with circular single-stranded DNA. Nature. doi:10.1038/295064a0

Tomas, M.E., Kundrapu, S., Thota, P., Sunkesula, V.C.K., Cadnum, J.L., Mana, T.S.C., Jencson, A., O'Donnell, M., Zabarsky, T.F., Hecker, M.T., Ray, A.J., Wilson, B.M., Donskey, C.J., 2015. Contamination of health care personnel during removal of personal protective equipment. J Am Meciacal Assoc Intern Med 175, 1904–1910. doi:10.1001/jamainternmed.2015.4535

Trible, B.R., Rowland, R.R.R., 2012. Genetic variation of porcine circovirus type 2 (PCV2) and its relevance to vaccination, pathogenesis and diagnosis. Virus Res 164, 68–77. doi:10.1016/j.virusres.2011.11.018

Trible, B.R., Kerrigan, M., Crossland, N., Potter, M., Faaberg, K., Hesse, R., Rowland, R.R.R., 2011. Antibody recognition of porcine circovirus type 2 capsid protein epitopes after vaccination, infection, and disease. Clin Vaccine Immunol 18, 749–757. doi:10.1128/CVI.00418-10

Turnage, N.L., Gibson, K.E., 2017. Sampling methods for recovery of human enteric viruses from environmental surfaces. J Virol Methods 248, 31–38. doi:10.1016/j.jviromet.2017.06.008

Verreault, D., Létourneau, V., Gendron, L., Masse, D., Gagnon, C.A., Duchaine, C., 2010. Airborne porcine circovirus in Canadian swine confinement buildings. Vet Microbiol 141, 224–230. doi:10.1016/j.vetmic.2009.09.013

Verreault, D., Moineau, S., Duchaine, C., 2008. Methods for sampling of airborne viruses. Microbiol Mol Biol Rev 72, 413–444. doi:10.1128/MMBR.00002-08

Vidal, J., 2020. Pasado, presente y futuro de la circovirosis.

Vidigal, P.M.P., Mafra, C.L., Silva, F.M.F., Fietto, J.L.R., Silva Júnior, A., Almeida, M.R., 2012. Tripping over emerging pathogens around the world: A phylogeographical approach for determining the epidemiology of Porcine circovirus-2 (PCV-2), considering global trading. Virus Res 163, 320–327. doi:10.1016/j.virusres.2011.10.019

Vigre, H., Bækbo, P., Jorsal, S.E., Bille-Hansen, V., Hassing, A.G., Enøe, C., Bøtner, A., 2005. Spatial and temporal patterns of pig herds diagnosed with Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS) during the first two years of its occurrence in Denmark. Vet Microbiol 110, 17–26. doi:10.1016/j.vetmic.2005.07.001

Vilalta, C., Sanhueza, J., Garrido, J., Murray, D., Morrison, R., Corzo, C.A., Torremorell, M., 2019. Indirect assessment of porcine reproductive and respiratory syndrome virus status in pigs prior to weaning by sampling sows and the environment. Vet Microbiol 237, 108406. doi:10.1016/j.vetmic.2019.108406

Vilalta, C., Sanhueza, J., Alvarez, J., Murray, D., Torremorell, M., Corzo, C.A., Morrison, R., 2018. Use of processing fluids and serum samples to characterize porcine reproductive and respiratory syndrome virus dynamics in 3 day-old pigs. Vet Microbiol 225, 149–156. doi:10.1016/j.vetmic.2018.09.006

Vincent, I.E., Carrasco, C.P., Herrmann, B., Meehan, B.M., Allan, G.M., Summerfield, A., McCullough, K.C., 2003. Dendritic Cells Harbor Infectious Porcine CircovirusType 2 in the Absence of Apparent Cell Modulation or Replication of theVirus. J Virol 77, 13288–13300. doi:10.1128/jvi.77.24.13288-13300.2003

Waddilove, J., Marco, E., 2002. Assessing serotherapeutic control of PMWS in the field, in: Proceedings of IPVS Congress. Ames, EE.UU, p. 34.

Watt, A.E., Browning, G.F., Markham, P.F., Marenda, M.S., 2020. Detection of naturally aerosolized *Actinobacillus pleuropneumoniae* on pig farms by cyclonic air sampling and qPCR. Vet Microbiol 250, 108856. doi:10.1016/j.vetmic.2020.108856

Weesendorp, E., Stegeman, A., Loeffen, W.L.A., 2009. Quantification of classical swine fever virus in aerosols originating from pigs

infected with strains of high, moderate or low virulence. Vet Microbiol 135, 222–230. doi:10.1016/j.vetmic.2008.09.073

Weesendorp, E., Landman, W.J.M., Stegeman, A., Loeffen, W.L.A., 2008. Detection and quantification of classical swine fever virus in air samples originating from infected pigs and experimentally produced aerosols. Vet Microbiol 127, 50–62. doi:10.1016/j.vetmic.2007.08.013

Wei, H., Lenz, S.D., Alstine, W.G. Van, Stevenson, G.W., Langohr, I.M., Pogranichniy, R.M., 2010. Infection of Cesarean-Derived Colostrum-Deprived Pigs with Porcine Circovirus Type 2 and Swine Influenza Virus. Comp Med 60, 45–50.

Welch, J., Bienek, C., Gomperts, E., Simmonds, P., 2006. Resistance of porcine circovirus and chicken anemia virus to virus inactivation procedures used for blood products. Transfusion 46, 1951–1958. doi:10.1111/j.1537-2995.2006.01003.x

Wellenberg, G.J., Stockhofe-Zurwieden, N., Boersma, W.J.A., de Jong, M.F., Elbers, A.R.W., 2004. The presence of co-infections in pigs with clinical signs of PMWS in The Netherlands: A case-control study. Res Vet Sci 77, 177–184. doi:10.1016/j.rvsc.2004.03.007

West, K.H., Bystrom, J.M., Wojnarowicz, C., Shantz, N., Jacobson, M., Gordon, M., Haines, D.M., Clark, E.G., Krakowka, S., Mcneilly, F., Konoby, C., Martin, K., Ellis, J.A., 1999. Myocarditis and abortion associated with intrauterine infection of sows with porcine circovirus 2. J Vet Diagn Invest 11, 530–532.

Wieland, B., Werling, D., Nevel, A., Grierson, S., Rycroft, A., Demmers, T.G., Cook, A.J.C., Done, S.H., Armstrong, D., Wathes, C.M., 2012. Porcine circovirus type 2 infection before and during an outbreak of postweaning multisystemic wasting syndrome on a pig farm in the UK. Vet Rec 170, 596. doi:10.1136/vr.100276

Wittwer, C.T., Makrigiorgos, G.M., 2012. Nucleic acid techniques, in: Burtis, C.A., Ashwood, E.R., Bruns, D.E. (Eds.), Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. Elsevier, pp. 47–86. doi:10.1016/B978-0-12-816061-9.00004-7

Witvliet, M., Holtslag, H., Nell, T., Segers, R., Fachinger, V., 2015. Efficacy and safety of a combined Porcine Circovirus and *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine in finishing pigs. Trials Vaccinol 4, 43–49. doi:10.1016/j.trivac.2015.04.002

Wójcik-Fatla, A., Sroka, J., Zając, V., Sawczyn-Domańska, A., Kloc, A., Zwoliński, J., Kłapeć, T., Studzińska, M.B., Chmura, R., Dutkiewicz, J., 2020. Potential sources of infection with selected zoonotic agents in the veterinary work environment – pilot studies. Ann Agric Environ Med 27, 146–150. doi:10.26444/aaem/115363

Woodbine, K.A., Medley, G.F., Slevin, J., Kilbride, A.L., Novell, E.J., Turner, M.J., Keeling, M.J., Green, L.E., 2007. Spatiotemporal patterns and risks of herd breakdowns in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. Vet Rec 160, 751–762.

Xiao, C.T., Harmon, K.M., Halbur, P.G., Opriessnig, T., 2016. PCV2d-2 is the predominant type of PCV2 DNA in pig samples collected in the U.S. during 2014–2016. Vet Microbiol 197, 72–77. doi:10.1016/j.vetmic.2016.11.009

Xiao, C.T., Halbur, P.G., Opriessnig, T., 2015. Global molecular genetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) sequences confirms the presence of four main PCV2 genotypes and reveals a rapid increase of PCV2d. J Gen Virol 2, 1830–1841. doi:10.1099/vir.0.000100

Xiao, C.T., Halbur, P.G., Opriessnig, T., 2012. Complete Genome Sequence of a Novel Porcine Circovirus Type 2b Variant Present in Cases of Vaccine Failures in the United States. J Virol 86, 12469–12469. doi:10.1128/JVI.02345-12

Yu, S., Opriessnig, T., Kitikoon, P., Nilubol, D., Halbur, P.G., Thacker, E., 2007. Porcine circovirus type 2 (PCV2) distribution and replication in tissues and immune cells in early infected pigs. Vet Immunol Immunopathol 115, 261–272. doi:10.1016/j.vetimm.2006.11.006

Zhai, S.L., Lu, S.S., Wei, W.K., Lv, D.H., Wen, X.H., Zhai, Q., Chen, Q.L., Sun, Y.W., Xi, Y., 2019. Reservoirs of Porcine Circoviruses: A Mini Review. Front Vet Sci 6, 1–6. doi:10.3389/fvets.2019.00319

Zhai, S.L., Wei, S.C., Li, L.X., Wen, X., Lv, M.L.D., Wei, W., 2016. Molecular detection and genome characterization of porcine circovirus type 2 in rats captured on commercial swine farms. Arch Virol 161, 3237–3244. doi:10.1007/s00705-016-3004-7

Zhai, S.L., Chen, S.-N., Wei, Z.-Z., Zhang, J.-W., Huang, L., Lin, T., Yue, C., Ran, Du.-L., Yuan, S.-S., Wie, W.-K., Long, J.-X., 2011. Co-existence of multiple strains of porcine circovirus type 2 in the same pig from China. Virol J 8, 517. doi:10.1186/1743-422X-8-517

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Zhang, H., Hu, W.Q., Li, J.Y., Liu, T.N., Zhou, J.Y., Opriessnig, T., Xiao, C.T., 2020. Novel circovirus species identified in farmed pigs designated as Porcine circovirus 4, Hunan province, China. Transbound Emerg Dis 67, 1057–1061. doi:10.1111/tbed.13446

Zhang, H., Li, Xin, Ma, R., Li, Xiaoxia, Zhou, Y., Dong, H., Li, Xinxian, Li, Q., Zhang, M., Liu, Z., Wei, B., Cui, M., Wang, H., Gao, J., Yang, H., Hou, P., Miao, Z., Chai, T., 2013. Airborne spread and infection of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus. Virol J 10, 1–7. doi:http://www.virologyj.com/content/10/1/204

Zhao, Y., Aarnink, A.J.A., Wang, W., Fabri, T., Groot Koerkamp, P.W.G., de Jong, M.C.M., 2014. Airborne virus sampling: Efficiencies of samplers and their detection limits for infectious bursal disease virus (IBDV). Ann Agric Environ Med 21, 464–471. doi:10.5604/12321966.1120585

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

9. ANEXOS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ANEXO I – MUESTRAS AMBIENTALES INCLUIDAS EN EL ESTUDIO I



Comedero de las cerdas



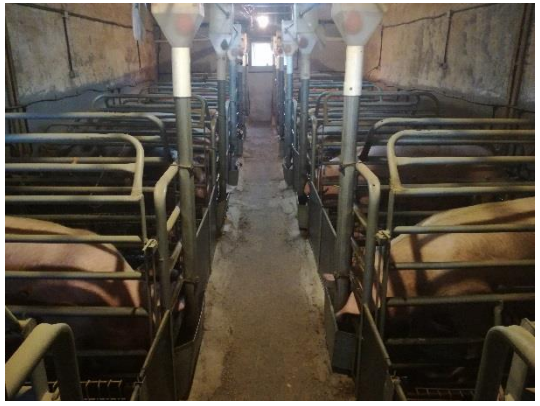
Jaula de las cerdas



Área de descanso de los lechones



Caja de lechones



Pasillos de las salas de partos



Ventiladores de las salas de partos

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA



Caja de utensilios



Tolvas de lechones



Pared de los corrales de transición



Suelo de los corrales de transición



Pasillos de las salas de transición



Polvo de los tabiques de las salas de transición

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA



Ventiladores de las salas de transición



Tolva de las cerdas



Pared de los corrales de gestación



Suelo de los corrales de gestación



Pasillos de las salas de gestación



Suelo del almacén

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA



Mango de los utensilios



Cazo de alimentación



Hidrolimpiadora



Tableros



Manos de los trabajadores



Ropa de trabajo / Ropa de calle

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



Botas de trabajo / Calzado de calle



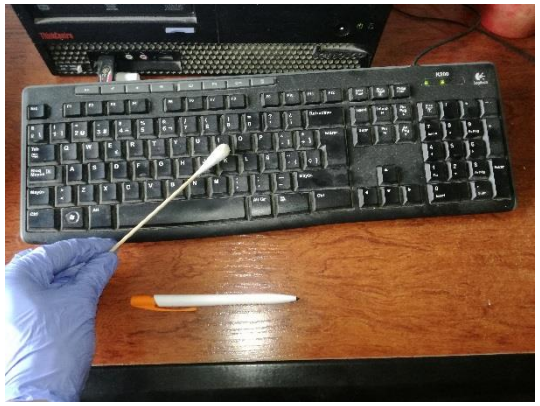
Vehículo



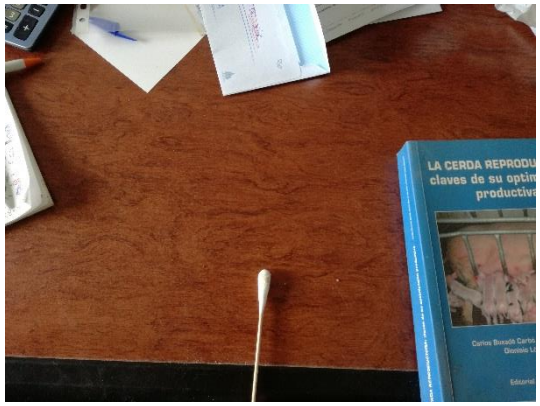
Suelo de la oficina



Pomo de las puertas de la oficina

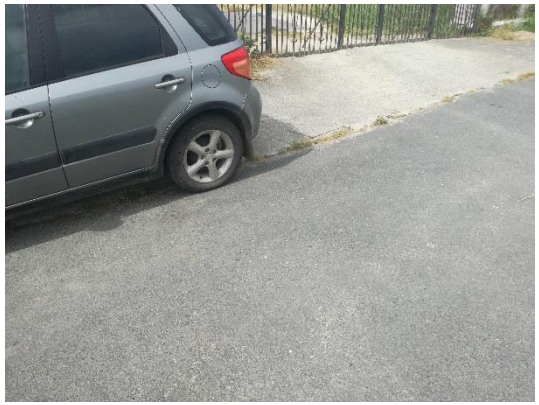


Bolígrafos / Teclado



Mesa / Sillas

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA



Parking



Entrada principal



Cargadero



Cabestrante contenedor cadáveres



Peldaño de silos

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ANEXO II – MUESTRAS AMBIENTALES INCLUIDAS EN EL ESTUDIO II



Pasillo de la explotación



Polvo de los tabiques



Tolva



Pared de los corrales



Suelo de los corrales

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ANEXO III – SCRIPT para la modificación del Tau de Kendall sugerido por Pimentel *et al.,* (2009)

```
tau2<-function(x,y){

  data=cbind(x,y)
  nz=which(apply(data,1,function(row) all(row[1]>0 & row[2]>0)))
  p_11=length(nz)/dim(data)[1]
  nz_data=data[nz,]

  if (length(nz)>1){
    if (length(which(!duplicated(nz_data[,1])))==1 |
length(which(!duplicated(nz_data[,2])))==1) {t_11=0}
    else {t_11= cor(nz_data[,1],nz_data[,2],method="kendall")}
  }
  else {t_11=0}

  p_01= (length(which(apply(data,1,function(row) all(row[1]==0 &
row[2]>0))))/dim(data)[1]
  p_10= (length(which(apply(data,1,function(row) all(row[2]==0 &
row[1]>0))))/dim(data)[1]
  p_00= (length(which(apply(data,1,function(row) all(row==0))))/dim(data)[1]


    tau_t<-(p_11^2*t_11+2*(p_00*p_11-p_01*p_10))
  sigma=2*tau_t*(p_00+p_11)-((p_11^2)*t_11*(2*p_11-(6*p_00)-
(4*p_11*t_11)))+4*p_01*p_10-(4*tau_t^2)
  pvalue<-(pnorm(tau_t, mean = 0, sd = sqrt(sigma/dim(data)[1]), lower.tail =
FALSE))
  result<-(list(tau_t,pvalue))
  names(result)<-c("tau","p-value")
  return(result)
}

tau2(x, y)
```

JOHN WILEY AND SONS LICENSE
TERMS AND CONDITIONS

Oct 20, 2021

This Agreement between University of Santiago de Compostela -- Gonzalo López-Lorenzo ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

License Number	5173001438352
License date	Oct 20, 2021
Licensed Content Publisher	John Wiley and Sons
Licensed Content Publication	Transboundary and Emerging Diseases
Licensed Content Title	Monitoring of porcine circovirus type 2 infection through air and surface samples in vaccinated and unvaccinated fattening farms
Licensed Content Author	Gonzalo López-Lorenzo, Cynthia López-Novo, Alberto Prieto, et al

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Licensed Content Date	Mar 23, 2021
Licensed Content Volume	0
Licensed Content Issue	0
Licensed Content Pages	10
Type of use	Dissertation/Thesis
Requestor type	Author of this Wiley article
Format	Print and electronic
Portion	Figure/table
Number of figures/tables	4
Will you be translating?	Yes, without English rights
Number of languages	1

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Title	Monitoring of porcine circovirus type 2 infection through air and surface samples in vaccinated and unvaccinated fattening farms.
Institution name	University of Santiago de Compostela
Expected presentation date	Dec 2021
Portions	Figure 1, Table 2, Table 3, Table 4
Specific Languages	Spanish
Requestor Location	University of Santiago de Compostela Avda Carballo Calero s/n Lugo, 27002 Spain Attn: University of Santiago de Compostela
Publisher Tax ID	EU826007151
Total	0.00 EUR

Terms and Conditions

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

TERMS AND CONDITIONS

This copyrighted material is owned by or exclusively licensed to John Wiley & Sons, Inc. or one of its group companies (each a"Wiley Company") or handled on behalf of a society with which a Wiley Company has exclusive publishing rights in relation to a particular work (collectively "WILEY"). By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the billing and payment terms and conditions established by the Copyright Clearance Center Inc., ("CCC's Billing and Payment terms and conditions"), at the time that you opened your RightsLink account (these are available at any time at http://myaccount.copyright.com).

Terms and Conditions

- The materials you have requested permission to reproduce or reuse (the "Wiley Materials") are protected by copyright.

- You are hereby granted a personal, non-exclusive, non-sub licensable (on a stand-alone basis), non-transferable, worldwide, limited license to reproduce the Wiley Materials for the purpose specified in the licensing process. This license, **and any CONTENT (PDF or image file) purchased as part of your order,** is for a one-time use only and limited to any maximum distribution number specified in the license. The first instance of republication or reuse granted by this license must be completed within two years of the date of the grant of this license (although copies prepared before the end date may be distributed thereafter). The Wiley Materials shall not be used in any other manner or for any other purpose, beyond what is granted in the license. Permission is granted subject to an appropriate acknowledgement given to the author, title of the material/book/journal and the publisher. You shall also duplicate the copyright notice that appears in the Wiley publication in your use of the Wiley Material. Permission is also granted on the understanding that nowhere in the text is a previously published source acknowledged for all or part of this Wiley Material. Any third party content is expressly excluded from this permission.

- With respect to the Wiley Materials, all rights are reserved. Except as expressly granted by the terms of the license, no part of the Wiley Materials may be copied, modified, adapted (except for minor reformatting required by the new Publication), translated, reproduced, transferred or distributed, in any form or by any means, and no derivative works may be made based on the Wiley Materials without the prior permission of the respective copyright owner.**For STM Signatory Publishers clearing permission under the terms of the STM Permissions Guidelines only, the terms of the license are extended to include subsequent editions and for editions**

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

in other languages, provided such editions are for the work as a whole in situ and does not involve the separate exploitation of the permitted figures or extracts, You may not alter, remove or suppress in any manner any copyright, trademark or other notices displayed by the Wiley Materials. You may not license, rent, sell, loan, lease, pledge, offer as security, transfer or assign the Wiley Materials on a stand-alone basis, or any of the rights granted to you hereunder to any other person.

- The Wiley Materials and all of the intellectual property rights therein shall at all times remain the exclusive property of John Wiley & Sons Inc, the Wiley Companies, or their respective licensors, and your interest therein is only that of having possession of and the right to reproduce the Wiley Materials pursuant to Section 2 herein during the continuance of this Agreement. You agree that you own no right, title or interest in or to the Wiley Materials or any of the intellectual property rights therein. You shall have no rights hereunder other than the license as provided for above in Section 2. No right, license or interest to any trademark, trade name, service mark or other branding ("Marks") of WILEY or its licensors is granted hereunder, and you agree that you shall not assert any such right, license or interest with respect thereto

- NEITHER WILEY NOR ITS LICENSORS MAKES ANY WARRANTY OR REPRESENTATION OF ANY KIND TO YOU OR ANY THIRD PARTY, EXPRESS, IMPLIED OR STATUTORY, WITH RESPECT TO THE MATERIALS OR THE ACCURACY OF ANY INFORMATION CONTAINED IN THE MATERIALS, INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, ANY IMPLIED WARRANTY OF MERCHANTABILITY, ACCURACY, SATISFACTORY QUALITY, FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE, USABILITY, INTEGRATION OR NON-INFRINGEMENT AND ALL SUCH WARRANTIES ARE HEREBY EXCLUDED BY WILEY AND ITS LICENSORS AND WAIVED BY YOU.

- WILEY shall have the right to terminate this Agreement immediately upon breach of this Agreement by you.

- You shall indemnify, defend and hold harmless WILEY, its Licensors and their respective directors, officers, agents and employees, from and against any actual or threatened claims, demands, causes of action or proceedings arising from any breach of this Agreement by you.

- IN NO EVENT SHALL WILEY OR ITS LICENSORS BE LIABLE TO YOU OR ANY OTHER PARTY OR ANY OTHER PERSON OR ENTITY FOR ANY

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

SPECIAL, CONSEQUENTIAL, INCIDENTAL, INDIRECT, EXEMPLARY OR PUNITIVE DAMAGES, HOWEVER CAUSED, ARISING OUT OF OR IN CONNECTION WITH THE DOWNLOADING, PROVISIONING, VIEWING OR USE OF THE MATERIALS REGARDLESS OF THE FORM OF ACTION, WHETHER FOR BREACH OF CONTRACT, BREACH OF WARRANTY, TORT, NEGLIGENCE, INFRINGEMENT OR OTHERWISE (INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, DAMAGES BASED ON LOSS OF PROFITS, DATA, FILES, USE, BUSINESS OPPORTUNITY OR CLAIMS OF THIRD PARTIES), AND WHETHER OR NOT THE PARTY HAS BEEN ADVISED OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES. THIS LIMITATION SHALL APPLY NOTWITHSTANDING ANY FAILURE OF ESSENTIAL PURPOSE OF ANY LIMITED REMEDY PROVIDED HEREIN.

- Should any provision of this Agreement be held by a court of competent jurisdiction to be illegal, invalid, or unenforceable, that provision shall be deemed amended to achieve as nearly as possible the same economic effect as the original provision, and the legality, validity and enforceability of the remaining provisions of this Agreement shall not be affected or impaired thereby.

- The failure of either party to enforce any term or condition of this Agreement shall not constitute a waiver of either party's right to enforce each and every term and condition of this Agreement. No breach under this agreement shall be deemed waived or excused by either party unless such waiver or consent is in writing signed by the party granting such waiver or consent. The waiver by or consent of a party to a breach of any provision of this Agreement shall not operate or be construed as a waiver of or consent to any other or subsequent breach by such other party.

- This Agreement may not be assigned (including by operation of law or otherwise) by you without WILEY's prior written consent.

- Any fee required for this permission shall be non-refundable after thirty (30) days from receipt by the CCC.

- These terms and conditions together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein) form the entire agreement between you and WILEY concerning this licensing transaction and (in the absence of fraud) supersedes all prior agreements and representations of the parties, oral or written. This Agreement may not be amended except in writing signed by both parties. This Agreement shall be binding upon and inure to the benefit of the parties' successors, legal representatives,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

and authorized assigns.

- In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall prevail.

- WILEY expressly reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.

- This Agreement will be void if the Type of Use, Format, Circulation, or Requestor Type was misrepresented during the licensing process.

- This Agreement shall be governed by and construed in accordance with the laws of the State of New York, USA, without regards to such state's conflict of law rules. Any legal action, suit or proceeding arising out of or relating to these Terms and Conditions or the breach thereof shall be instituted in a court of competent jurisdiction in New York County in the State of New York in the United States of America and each party hereby consents and submits to the personal jurisdiction of such court, waives any objection to venue in such court and consents to service of process by registered or certified mail, return receipt requested, at the last known address of such party.

WILEY OPEN ACCESS TERMS AND CONDITIONS

Wiley Publishes Open Access Articles in fully Open Access Journals and in Subscription journals offering Online Open. Although most of the fully Open Access journals publish open access articles under the terms of the Creative Commons Attribution (CC BY) License only, the subscription journals and a few of the Open Access Journals offer a choice of Creative Commons Licenses. The license type is clearly identified on the article.

The Creative Commons Attribution License

The Creative Commons Attribution License (CC-BY) allows users to copy, distribute and transmit an article, adapt the article and make commercial use of the article. The CC-BY license permits commercial and non-

Creative Commons Attribution Non-Commercial License

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

The Creative Commons Attribution Non-Commercial (CC-BY-NC)License permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.(see below)

Creative Commons Attribution-Non-Commercial-NoDerivs License

The Creative Commons Attribution Non-Commercial-NoDerivs License (CC-BY-NC-ND) permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited, is not used for commercial purposes and no modifications or adaptations are made. (see below)

Use by commercial "for-profit" organizations

Use of Wiley Open Access articles for commercial, promotional, or marketing purposes requires further explicit permission from Wiley and will be subject to a fee.

Further details can be found on Wiley Online Library
http://olabout.wiley.com/WileyCDA/Section/id-410895.html

Other Terms and Conditions:

v1.10 Last updated September 2015

Questions? customercare@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA


USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA